

THESIS

LIÈGE

1966

HERMAN DENIS

Docteur en Sciences Zoologiques - Chercheur qualifié du F. N. R. S.

ACTIVITÉ DES GÈNES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

THÈSE D'AGRÉGATION DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

HERMAN DENIS

Docteur en Sciences Zoologiques - Chercheur qualifié du F. N. R. S.

**ACTIVITÉ DES GÈNES
AU COURS DU
DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

1966

THÈSE D'AGRÉGATION DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

Le présent mémoire peut être livré à l'impression.

Liège, le 18 novembre 1966.

Le Secrétaire de la Faculté

Secrétaire du Jury,

J. SERPE.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Président du Jury,

L. WINAND.

Article 6 de l'arrêté royal du 10 mars 1931 appliquant la loi du 21 mai 1929 sur la collation des grades académiques et le programme des examens universitaires :

« En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées, par le fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme étant celles du Jury ou de l'Université. »



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153502_0055

A la mémoire de Monsieur le Professeur H. Damas.

SOMMAIRE

Introduction	5
 Première partie. — Influence de l'actinomycine sur le développement embryonnaire	
Introduction	13
Chapitre I. — Influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques	15
1. <i>Matériel et méthodes</i>	15
2. <i>Résultats</i>	18
2.1 Influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques dans l'ectoderme neural présomptif et le tissu nerveux	18
2.2 Influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques dans la lèvre dorsale du blastopore, le toit de l'archenteron et les somites	20
2.3 Influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques dans le tissu végétatif de la gastrula et dans l'endoderme	22
2.4 Proportion d'uridine incorporée dans le RNA et dans le DNA	24
3. <i>Discussion</i>	26
4. <i>Conclusion</i>	27
Chapitre II. — Influence de l'actinomycine sur la synthèse des protéines	28
1. <i>Méthodes</i>	28
2. <i>Résultats</i>	31
2.1 Influence de l'actinomycine sur la synthèse protéique dans les tissus ecto-mésodermiques	31
2.2 Influence de l'actinomycine sur la synthèse protéique dans le tissu endodermique	32
2.3 Influence de l'actinomycine sur la perméabilité cellulaire	33
3. <i>Discussion</i>	33
4. <i>Conclusion</i>	34
Chapitre III. — Influence de l'actinomycine sur la compétence de l'ectoderme et sur le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale	35
1. <i>Méthode</i>	35
2. <i>Critères d'identification du tissu nerveux</i>	36

3. <i>Résultats</i>	36
3.1 Première expérience : influence de l'actinomycine sur la différenciation des sandwiches cultivés tout entiers dans l'antibiotique	36
3.2 Deuxième expérience : influence de l'actinomycine sur la compétence de l'ectoderme	42
3.3 Troisième expérience : influence de l'actinomycine sur le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale	46
3.4 Quatrième expérience : influence de l'actinomycine sur le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale. Contact de durée limitée entre l'ectoderme et le tissu inducteur	50
4. <i>Discussion</i>	52
5. <i>Conclusion</i>	56

Deuxième partie. — Libération de l'information génétique au cours du développement embryonnaire

<i>Introduction</i>	59
Chapitre I. — Validité de la méthode employée : hybridations entre les acides nucléiques de la même espèce ou d'espèces différentes	62
1. <i>Matériel et méthodes</i>	62
2. <i>Résultats</i>	69
2.1 Spécificité d'espèce des hybridations DNA-DNA et DNA-RNA	69
2.2 Stabilité thermique du DNA et du RNA hybridés	74
2.3 Sensibilité à la RNase des hybrides DNA-RNA	76
2.4 Séquences du DNA impliquées dans la formation d'hybrides à diverses températures	77
2.5 Influence de l'actinomycine sur la formation des hybrides	78
2.6 Identité des préparations de DNA extraites de divers tissus	80
2.7 Saturation du DNA adulte par le DNA embryonnaire	81
2.8 Pourcentage de DNA lié en fonction de la quantité de DNA offerte pour l'hybridation	81
3. <i>Discussion</i>	83
4. <i>Conclusion</i>	85
Chapitre II. — Propriétés du RNA messenger synthétisé par les embryons en voie de développement	86
1. <i>Méthodes</i>	86
2. <i>Résultats</i>	86
2.1 Hybridation du RNA embryonnaire avec des quantités croissantes de DNA emprisonné dans l'agar	86
2.2 Composition en bases et stabilité thermique du RNA hybridable synthétisé par les embryons en voie de développement	88
2.3 Vitesse de dégradation du messenger présent dans les embryons en voie de développement	91

3. <i>Discussion</i>	95
4. <i>Conclusion</i>	97
Chapitre III. — Type de messenger transcrit dans les embryons en croissance	99
1. <i>Méthodes</i>	99
2. <i>Principe des expériences de compétition</i>	104
3. <i>Résultats</i>	107
3.1 Expériences de compétition	107
3.2 Expériences de saturation	115
3.3 Degré d'homologie entre les messagers présents dans les embryons de différents stades	119
3.4 Origine du messenger instable présent dans les embryons différenciés	122
3.5 Quantité de messenger présent dans les embryons de divers stades	122
4. <i>Discussion</i>	124
4.1 Validité de la méthode employée	124
4.2 Résumé des résultats	125
4.3 La production de RNA messenger au cours du développement embryonnaire	130
4.4 Rôle possible du RNA messenger stable et instable	132
5. <i>Conclusion</i>	133
Conclusion générale	135
Bibliographie	141
Résumé	145

INTRODUCTION

Le maintien et l'évolution de la vie sur notre planète sont assurés par un mécanisme qui remplit deux fonctions en apparence contradictoires : d'une part, la transmission des caractères héréditaires d'une génération d'êtres vivants à l'autre et d'autre part, la transformation de ces mêmes caractères, seule cause possible de toute évolution. Que l'altération d'un trait spécifique dans une génération donnée puisse se transmettre de façon indéfinie aux descendants montre tout à la fois la plasticité et la rigidité du système assumant le transfert des caractères patrimoniaux. Etant donné la lenteur — considérée à notre échelle — à laquelle évoluent les êtres vivants, il n'est guère possible d'observer des changements dans les traits héréditaires, qui puissent être interprétés sans contestation comme le fait de l'évolution elle-même. Limitons donc notre attention au seul aspect conservateur de la transmission du patrimoine génétique. Cytologistes et généticiens se sont très tôt appliqués à rechercher quelle pourrait être la structure cellulaire, ou mieux la substance chimique, en qui seraient inscrits les caractères transmissibles. Aux yeux des microscopistes, le noyau des cellules — et plus particulièrement les chromosomes — est apparu comme l'endroit où l'information génétique est conservée. Visiblement, cette information se lègue de cellule en cellule et de génération en génération. Pour les généticiens, le support matériel en même temps que l'agent de transmission des caractères héréditaires est le gène. Une convergence d'observations génétiques et cytologiques a permis de localiser les gènes au niveau des chromosomes. Ceux-ci étaient naguère considérés comme des empilements de gènes, lesquels seraient même visibles dans certains chromosomes de grande taille sous la forme de disques opaques, séparés les uns des autres par des espaces clairs.

La substance porteuse de l'information génétique a été relativement vite identifiée comme étant l'acide désoxyribonucléique (DNA). Les histochimistes ont depuis longtemps disposé d'un moyen sûr pour mettre en évidence le DNA : la réaction de FEULGEN. Grâce à celle-ci, ils se sont aperçus que le DNA ne se

rencontre jamais en quantité importante en dehors du noyau cellulaire ; il est un des constituants principaux des chromosomes ; il est présent en quantité relativement constante dans les noyaux de chaque espèce et se répartit de façon égale entre les deux cellules-filles lors de la mitose. De leur côté, les généticiens ont constaté que, si l'on altère la structure du DNA par des moyens physiques ou chimiques, on modifie les caractères héréditaires. Pour les biochimistes, le DNA est apparu comme une substance très stable chimiquement, formée de longues chaînes constituant une répétition indéfinie d'un petit nombre d'éléments de base. Toutes ces observations concordaient à faire du DNA le candidat le plus indiqué pour le rôle de transporteur des caractères héréditaires.

De grosses difficultés, surtout d'ordre théorique, restaient cependant à résoudre. Une des moindres n'était pas de rendre compte comment l'apparition de caractères morphologiques extrêmement compliqués pouvait être contrôlée par une structure moléculaire apparemment si simple que le DNA. Celui-ci ne comporte, en effet, que 3 éléments constitutants : un sucre — toujours le même — le désoxyribose ; du phosphate servant de lien entre deux molécules de désoxyribose successives ; enfin une base purique ou pyrimidique. Cette base peut être l'adénine, la guanine, la cytosine ou la thymine. L'ensemble phosphate-base-sucre forme un nucléotide et constitue l'unité de construction du DNA. Il est évident qu'avec 4 unités de base différentes, il est possible d'élaborer une variété infinie de séquences nucléotidiques. Notre connaissance de l'architecture moléculaire du DNA en est restée à ces notions rudimentaires jusqu'à ce que WATSON et CRICK (1953), se basant sur des études cristallographiques, proposent un modèle très plausible pour la structure du DNA. Suivant celui-ci, le DNA se présente sous la forme d'une double hélice, ou encore de deux câbles enroulés l'un sur l'autre. Les deux brins qui constituent la double hélice adhèrent l'un à l'autre grâce à des ponts d'hydrogène établis, d'une part, entre la guanine (G) et la cytosine (C), et de l'autre, entre l'adénine (A) et la thymine (T). Ce modèle présentait au début le gros avantage d'expliquer l'égalité toujours observée et jamais comprise, de la teneur en G et C, d'une part, en A et T, d'autre part, de tous les DNAs analysés jusqu'alors. Le modèle de WATSON-CRICK s'est révélé par la suite en tous points adéquat. Il a permis notamment de voir plus clair dans le processus de réplication du DNA.

Connaissant l'architecture moléculaire du DNA, il nous reste

encore à expliquer comment une succession de 4 éléments, constituant une sorte de code, peut se traduire dans les cellules et dans l'organisme par l'apparition de caractères ou de fonctions bien précises. Un grand progrès vers la solution de ce problème a été réalisé quand on s'est rendu compte que tous les processus vitaux sont régis par un certain nombre de substances douées d'activité catalytique. Ces substances, appelées enzymes, sont de nature protéique. Or les propriétés des protéines sont déterminées par l'ordre dans lequel sont enchaînés les 20 acides aminés qui les forment. Le contrôle du métabolisme cellulaire repose donc essentiellement sur la manière dont se succèdent les acides aminés dans les protéines. Un autre pas en avant a été accompli lorsque s'est imposée la conviction que la synthèse des enzymes est sous la dépendance directe des gènes. Cette notion, exprimée de façon lapidaire par la formule « un gène, un enzyme », a été complétée par une autre, tout aussi importante, qui est celle de la colinéarité des séquences nucléotidiques présentes dans le DNA et des séquences d'acides aminés présentes dans les protéines. En d'autres mots, ceci signifie que la structure primaire de toutes les protéines est inscrite en code dans le DNA. Nous touchons ici le mécanisme fondamental par lequel le DNA contrôle toute l'activité cellulaire. Il s'agit maintenant de démontrer ce mécanisme. Ce sera chose faite si nous pouvons répondre à la question suivante : comment la suite de bases qui constitue le DNA se traduit-elle en la suite d'acides aminés qui constitue les protéines ?

Il y a 25 ans déjà, BRACHET et CASPERSSON présentaient indépendamment que l'acide ribonucléique (RNA) était impliqué d'une façon ou d'une autre dans la synthèse des protéines. Cette intuition reposait notamment sur le fait que l'importance de la synthèse protéique dans les cellules est, en gros, proportionnelle à la teneur de celles-ci en RNA. Il a fallu cependant attendre 20 ans pour que le rôle du RNA dans la formation des protéines soit mis en pleine lumière. La théorie du messenger de JACOB et MONOD (1961), amorce d'une biologie nouvelle, postule l'existence d'un produit intermédiaire, de nature ribonucléique, entre le DNA et les protéines. Ce RNA, appelé messenger, constitue une copie exacte, mais complémentaire, du DNA. En d'autres termes, à chaque résidu T ou G du DNA correspond un résidu A ou C dans le messenger et vice versa. Le RNA messenger est traduit directement sous forme de protéines grâce à un mécanisme d'identification et de mise en chaîne des acides aminés. Chacun de ceux-ci est pris en charge par un transporteur spécifique, appelé RNA soluble (HOAGLAND,

STEPHENSON, SCOTT, HECHT et ZAMECNIK, 1958), qui le reconnaît et l'insère dans la chaîne polypeptidique naissante. Celle-ci se forme sur une structure nucléoprotéique désignée sous le nom de ribosome, qui se déplace le long du messenger en « lisant » ce dernier d'un bout à l'autre. L'ordre d'intégration de chaque acide aminé dans la protéine est fixé par la séquence de bases que constitue le messenger. Le signal d'incorporation d'un acide aminé défini est donné par un groupe de 3 bases appelé « triplet » ou « codon » (CRICK, 1963). La traduction des suites de triplets en suites d'acides aminés se fait suivant un code, dit code génétique, qui est aujourd'hui presque entièrement déchiffré (NIRENBERG, LEDER, BERNFIELD, BRIMACOMBE, TRUPIN, ROTTMAN et O'NEAL, 1965). La clé de ce code est inscrite dans les RNAs solubles, chargés d'insérer l'acide aminé qu'ils portent à la place définie par un triplet donné du messenger. Le code génétique est en apparence universel, c'est-à-dire qu'un même triplet servirait à identifier un même acide aminé dans toute la série animale. Le code est, au surplus, « dégénéré », ce qui signifie que l'insertion d'un même acide aminé peut être commandée par plusieurs triplets différents. Ainsi, la leucine est codée par chacun des groupes suivants : UUA, UUG, CUA, CUG et peut-être aussi CUU et CUC.

La théorie du messenger a été formulée à l'origine pour les Bactéries. Elle a trouvé de nombreuses vérifications expérimentales. Chez les organismes multicellulaires, l'application de la théorie se complique du fait que l'information contenue dans le DNA trouve une expression différente dans les divers tissus. Chez un Vertébré, le DNA dirige dans tel organe la synthèse de la myosine, dans tel autre, celle de collagène ou de kératine, grâce à un mécanisme d'activation et de répression des gènes qui est loin d'être élucidé à l'heure actuelle. Si ce mécanisme reste incompris, tout au moins peut-on constater ses effets : le type de messenger transcrit varie d'un tissu adulte à l'autre (SCHOLTISSEK, 1962 ; MAC CARTHY et HOYER, 1964 ; KIDSON et KIRBY, 1964).

L'organisme multicellulaire s'édifie à chaque génération nouvelle à partir d'une cellule de plus ou moins grande taille : l'œuf fécondé. Celui-ci reçoit en une seule copie — un assortiment de chromosomes — toute l'information nécessaire à l'élaboration des nombreux types cellulaires qui forment l'organisme adulte. La manière dont cette élaboration se produit constitue le problème central de l'embryologie. Si la transcription du génome se fait chez les organismes multicellulaires comme elle a lieu chez les Bacté-

ries, on peut s'attendre à ce que le DNA joue un rôle directeur dans les phénomènes de différenciation. Autrement dit, le DNA devrait envoyer, à mesure que les tissus se forment, l'information nécessaire à leur édification. Nous nous proposons de rechercher si une telle hypothèse peut être vérifiée par les faits. Nous emploierons pour cela deux méthodes expérimentales. L'une consistera à interrompre l'envoi d'information par le DNA et de voir si cette suspension a une influence quelconque sur le développement embryonnaire. L'autre sera de déterminer par les techniques récentes de la biologie moléculaire le type de messenger transcrit dans les embryons en voie de différenciation. Cette étude sera faite sur les Amphibiens, seule classe de Vertébrés capable de fournir en grande abondance des œufs dont la charge en vitellus n'est pas excessive. Ces deux conditions sont indispensables pour toute expérimentation biochimique au niveau considéré.

PREMIÈRE PARTIE

**INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE
SUR
LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

INTRODUCTION

Il existe une famille de substances, les actinomycines, qui présentent la propriété remarquable de se fixer sur le DNA (*) et d'empêcher ainsi la synthèse du RNA messenger et, partant, des protéines. Ce mode d'action de l'actinomycine a été observé tant chez les organismes simples (KIRK, 1960 ; HARBERS et MUELLER, 1962) que dans les cellules de Mammifères (GOLDBERG et RABINOWITZ, 1962 ; PERRY, 1963). L'actinomycine inhibe fortement la polymérase du RNA et relativement peu celle du DNA (REICH, 1964). Des effets secondaires sur le RNA lui-même ont été signalés à diverses reprises (ACS, REICH et VALANJU, 1963 ; REVEL, HIATT et REVEL, 1964 ; SHATKIN, SEBRING et SALZMAN, 1965).

L'actinomycine n'agirait donc pas uniquement au niveau du DNA. Malgré ces restrictions, l'actinomycine est généralement considérée comme un agent capable de priver les cellules de l'information génétique contenue dans leur noyau. L'action de cet antibiotique sur le développement embryonnaire sera étudiée.

Objet et plan du travail.

L'imperméabilité des œufs d'Amphibiens à l'actinomycine (BRACHET et DENIS, 1963) nous a forcé à limiter l'étude des effets de cet antibiotique aux stades initiaux de la différenciation. Seuls les jeunes embryons se prêtent, en effet, à la dissection et à la culture de fragments de tissus, artifice nécessaire pour permettre la pénétration de l'antibiotique dans les cellules. Dans ces conditions, il était indiqué d'examiner l'action de l'actinomycine sur une des premières manifestations de la différenciation embryon-

(*) Abréviations employées : DNA, acide désoxyribonucléique ; RNA, acide ribonucléique ; mRNA, RNA messenger ; sRNA, RNA soluble ou de transfert ; rRNA, RNA ribosomique ; DNase, désoxyribonucléase ; RNase, ribonucléase ; A, adénine ; C, cytosine ; G, guanine ; T, thymine ; U, uracile ; AMP, CMP, GMP, UMP, monophosphates de A, C, G, U ; EDTA, tétra-acétate d'éthylène-diamine ; SDS, dodécylsulfate de sodium ; SSC, NaCl, 0,15 M + citrate de Na, 0,015 M ; TCA, acide trichloracétique ; cpm, coups par minute ; tpm, tours par minute ; mC, millicurie ; μ C, microcurie ; m μ g, millimicrogramme ; Tm, température de fusion.

naire, à savoir la formation du système nerveux. Chez les Vertébrés, on sait que celui-ci ne se forme pas spontanément à partir de l'ectoderme. Il n'apparaît que si ce dernier est soumis à l'influence inductrice du mésoderme. L'embryologie classique offre un moyen éprouvé d'étudier l'interaction des tissus au cours du processus d'induction. Ce moyen sera mis à profit dans le présent travail. Il s'agit d'isoler par dissection le tissu inducteur (lèvre dorsale du blastopore) et le tissu réacteur (plafond du blastocœle) et de les mettre en contact, de manière qu'ils puissent agir l'un sur l'autre. Cette technique, dite du « sandwich », outre qu'elle assure une bonne pénétration de l'actinomycine dans la cellule, présente au surplus l'avantage de permettre l'étude séparée du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale et du pouvoir réacteur (compétence) de l'ectoderme.

Avant d'examiner les effets de l'actinomycine sur la différenciation primaire, il importe de vérifier si l'antibiotique produit bien sur les cellules embryonnaires les effets qu'on attend de lui, à savoir une inhibition de la synthèse du RNA et de celle des protéines. Les *deux premiers chapitres* seront consacrés à ces vérifications. Pour examiner l'influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques, la méthode autoradiographique sera utilisée. Pour l'étude de la synthèse protéique, on recourra à des procédés biochimiques. L'action de l'actinomycine sera étudiée dans plusieurs tissus et à divers stades de développement. Dans un *troisième chapitre*, on examinera l'influence de l'actinomycine sur la différenciation morphologique du tissu nerveux.

CHAPITRE 1

INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Toutes les expériences concernant l'influence de l'actinomycine sur les cellules embryonnaires ont été faites sur le triton nord-africain *Pleurodeles waltlii*. Les œufs de cette espèce, relativement peu abondants (quelques centaines par ponte), se prêtent bien aux travaux de microchirurgie en raison de leur grande taille et de la facilité avec laquelle on peut les débarrasser de leurs enveloppes (albumine et chorion). Toutefois, seules les études biochimiques ne requérant qu'une petite quantité de substance peuvent être menées à bien sur ce matériel.

Obtention des œufs.

Les œufs sont obtenus après accouplement spontané des animaux. Chaque couple est isolé pendant plusieurs jours dans un aquarium maintenu à 20 °C et largement pourvu de petits cailloux et de plantes, sur lesquelles la femelle puisse déposer ses œufs. Ceux-ci sont prélevés tout de suite après la ponte et gardés à la température ordinaire dans de grands cristallisoirs remplis d'eau de ville, jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade voulu. Les stades de développement sont numérotés suivant la table de GALLIEN et DUROCHER (1957).

Prélèvement de fragments de tissus.

En raison de la grande imperméabilité des œufs de pleurodèle vis-à-vis des précurseurs des acides nucléiques (BIELIAVSKY et TENCER, 1960), il a fallu disséquer les embryons avant de les exposer au traceur. De la sorte, la face intérieure des cellules, non protégée par pellicule superficielle est mise en contact direct avec

le produit marqué et celui-ci peut pénétrer dans les tissus. Après l'enlèvement des enveloppes albumineuses, les embryons sont rincés plusieurs fois à l'eau stérile et transférés dans le récipient d'opération. Le fond de celui-ci est couvert d'une couche d'agar 1,5 % stérile. Le milieu d'opération est préparé suivant la formule de NIU et TWITTY (1953). Les embryons sont débarrassés de leur chorion au moyen de fines brucelles et disséqués à l'aide d'une aiguille et d'une anse de platine stérilisées par passage à la flamme.

Les échantillons suivants ont été prélevés :

— *au stade 8-9* (début de la gastrulation) :

- 1) un fragment d'ectoderme présomptif provenant de la partie animale de l'œuf ;
- 2) la lèvre dorsale du blastopore ;
- 3) un fragment d'endoderme présomptif provenant de la zone végétative de l'œuf ;

— *au stade 12* (milieu de la gastrulation) :

- 1) un rectangle d'ectoderme neural présomptif auquel adhère le toit de l'archenteron ;
- 2) un fragment d'endoderme provenant de la partie ventrale de la gastrula ;

— *au stade 15* (début de la neurulation : plaque neurale bien dessinée) :

les mêmes tissus qu'au stade 12 ;

— *au stade 21* (neurulation terminée : bourrelets neuraux joints) :

- 1) le tube nerveux (débarrassé autant que possible de l'épiderme qui le recouvre), auquel adhère l'axe chordo-somitique ;
- 2) un fragment d'endoderme ;

— *au stade 24* (bourgeon caudal en formation),

— *au stade 27* (premiers battements cardiaques) :
les mêmes tissus qu'au stade 21.

Exposition des tissus au traceur et procédé autoradiographique.

Les fragments de tissu, au nombre de 3 pour chaque catégorie, sont placés dans 1 ml de milieu de NIU et TWITTY stérile additionné, soit de 10 μ C d'uridine tritiée (témoins), soit de 10 μ C

d'uridine tritiée (activité spécifique : 1080 μC par millimole) + 10 μg d'actinomycine D. Deux durées d'incorporation ont été utilisées : 6 et 20 heures à la température ordinaire. Les explantats séjournent pendant tout ce temps à l'obscurité pour éviter la dégradation de l'actinomycine par la lumière. Une fois l'incorporation terminée, les fragments de tissu sont rincés dans le milieu de culture normal, puis fixés, soit à l'alcool-acétique froid (4 °C), soit par la méthode de la congélation-substitution de LISON (1953). Après déshydratation et inclusion par les procédés habituels, les morceaux de tissu sont coupés à 10 μ et répartis alternativement sur 5 porte-objets. Dans chaque série de cinq lames, une première subit une digestion à la RNase (0,2 mg/ml ; 1 heure à 37 °C), une seconde subit une digestion à la DNase (0,1 mg/ml ; pH 7,5 ; 1 heure à 37 °C), une troisième est traitée pendant 1 heure à 37 °C par la solution-tampon utilisée pour la digestion à la DNase. Les deux dernières lames sont placées pendant une heure à 4 °C dans une solution d'uridine 0,1 M non marquée afin d'entraîner le précurseur non incorporé. Quatre porte-objets de chaque série (3 incubés + 1 non incubé) sont alors couverts d'une fine couche d'émulsion Ilford K 2 suivant le procédé mis au point par FICQ (1961). La cinquième lame de chaque série ne reçoit pas d'émulsion et sert de témoin pour le comptage des grains de mélanine. Au bout de 28 jours d'exposition, les lames sont développées et colorées à l'UNNA.

Comptage des traces.

La présence de nombreux grains de mélanine dans le cytoplasme des œufs de pleurodèle rend difficile l'évaluation de la radioactivité. Les traces de tritium ont, en effet, un trajet très court dans l'émulsion et se présentent comme des grains fort semblables à ceux de la mélanine. Ce fait rend impossible toute estimation quantitative de la radioactivité cytoplasmique, en particulier dans les tissus dorsaux, et complique même l'évaluation de l'activité nucléaire. Si le noyau est situé sous la surface de la coupe et est donc surmonté d'une mince couche de cytoplasme, des grains de pigment peuvent s'ajouter aux traces produites par la radioactivité nucléaire et fausser la mesure de celle-ci. Pour pallier cet inconvénient, les traces ont été comptées, d'une part, au-dessus de 100 noyaux couverts d'émulsion et, d'autre part, au-dessus de 100 noyaux non recouverts. En soustrayant le nombre de coups obtenus par noyau dans le second comptage de celui du premier, on arrive à une estimation approchée de la radioactivité nucléaire.

2. RÉSULTATS.

2.1 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS L'ECTODERME NEURAL PRÉSOMPTIF ET LE TISSU NERVEUX.

Radioactivité nucléaire.

La figure 1 montre l'influence de l'actinomycine sur l'incorporation nucléaire d'uridine après 6 heures et 20 heures de contact avec le traceur. Chaque point est la moyenne du nombre de coups décelés au-dessus de 100 noyaux. Après 6 heures d'incorporation

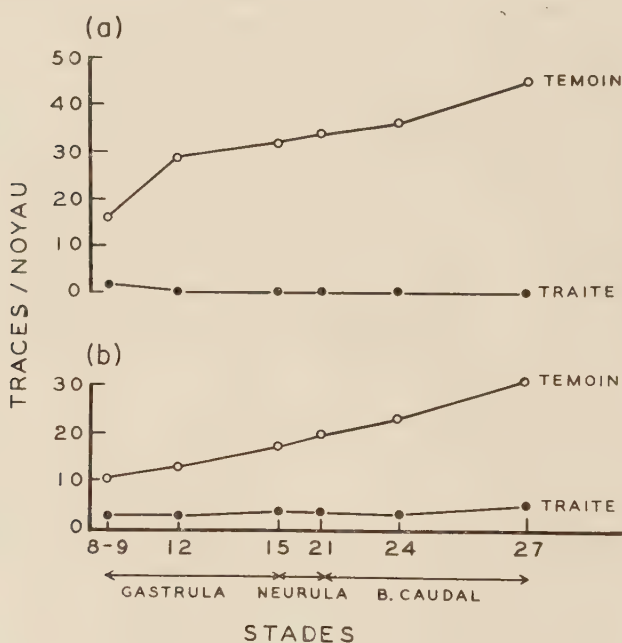


FIGURE 1.

Influence de l'actinomycine sur l'incorporation nucléaire d'uridine tritiée dans le tissu nerveux. Six heures (b) et 20 heures (a) d'incorporation en présence et en l'absence d'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$).

en l'absence d'actinomycine, le marquage nucléaire augmente assez régulièrement depuis le début de la gastrulation jusqu'au stade 27. Dans les tissus traités, la radioactivité est si faible qu'il est à peine possible de l'évaluer, étant donné l'imprécision des comptages due à la présence de pigment.

Les figures 2 et 3 illustrent l'influence de l'actinomycine sur le marquage nucléaire. Les noyaux de tissu nerveux non traité (fig. 2) sont bien colorés à l'UNNA et sont assez fortement marqués. Les noyaux du même tissu ayant séjourné 6 heures dans l'actinomycine sont extrêmement pâles et leur radioactivité est presque nulle (1-2 coups).

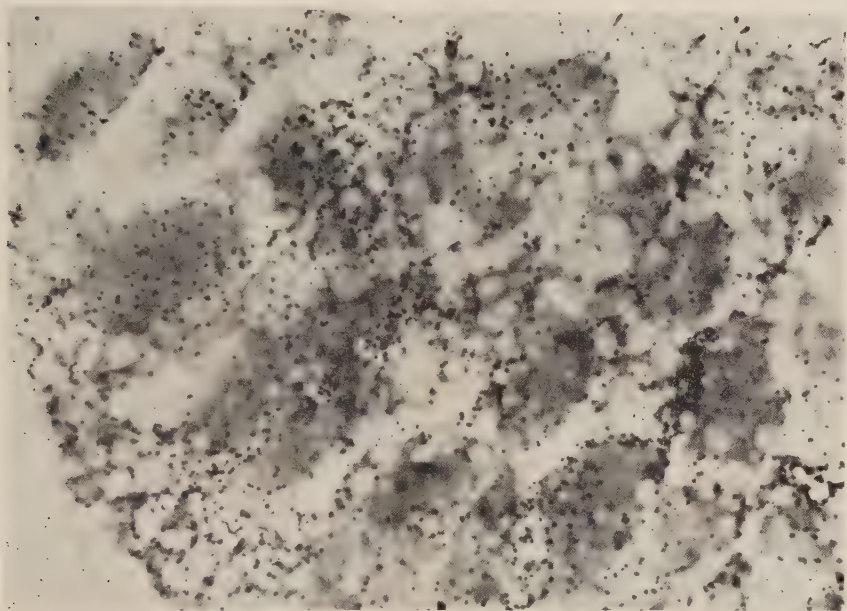


FIGURE 2.

Tissu nerveux de stade 27 mis au contact d'uridine tritiée ($10 \mu\text{C}/\text{ml}$) pendant 6 heures. Coupe à 10μ couverte d'émulsion K2 et exposée pendant 28 jours. Incorporation nucléaire assez forte. Les grains visibles dans le cytoplasme sont des grains de pigment et des traces de tritium. Grossissement : $\times 1.080$.

Après 20 heures de contact avec le traceur, le marquage des noyaux est plus intense qu'après 6 heures d'incorporation. La radioactivité nucléaire s'accroît assez fortement depuis le stade 8-9 jusqu'au stade 27. Quant aux tissus traités à l'actinomycine pendant 20 heures, ils sont en voie de désagrégation et les noyaux qui ne montrent pas encore de signes de pycnose ne sont pas du tout radioactifs [fig. 1 (a)].

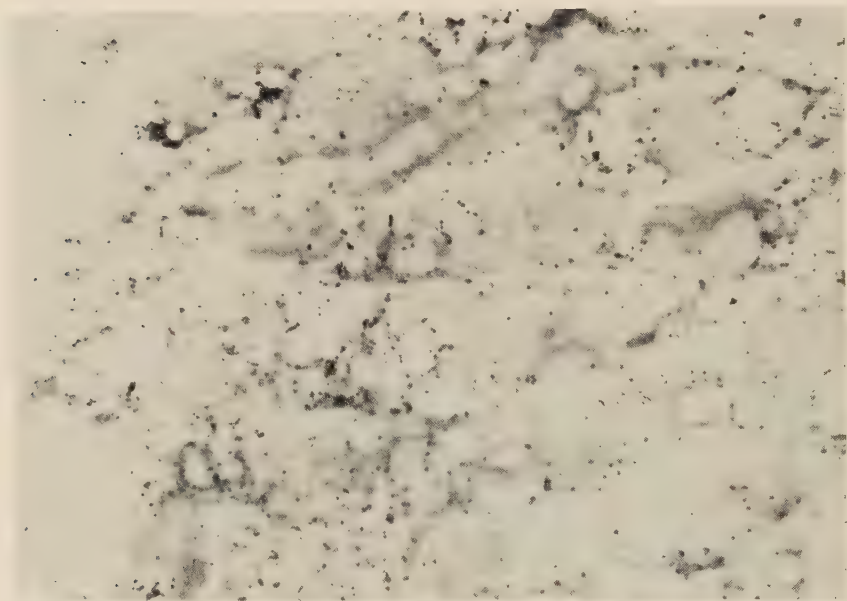


FIGURE 3.

Même tissu que sur la figure 2 mis au contact d'uridine tritiée (10 $\mu\text{C}/\text{ml}$) et d'actinomycine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Incorporation nucléaire très faible. Incorporation cytoplasmique réduite également. Grossissement : $\times 1.080$.

Radioactivité cytoplasmique.

Un marquage cytoplasmique sensible à la RNase peut être décelé à partir de la gastrulation dans l'ectoderme neural pré-somptif (fig. 2). Le marquage cytoplasmique est beaucoup plus prononcé après 20 heures qu'après 6 heures de contact avec le traceur. L'actinomycine diminue grandement la radioactivité extra-nucléaire, mais ne semble pas l'abolir tout à fait.

2.2 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LA LÈVRE DORSALE DU BLASTOPORE, LE TOIT DE L'ARCHENTERON ET LES SOMITES.

Radioactivité nucléaire.

Comme le montre la figure 4, la radioactivité nucléaire est plus faible dans le mésoderme que dans le tissu nerveux aussi bien après 6 heures qu'après 20 heures de contact avec le précurseur. Au bout de 6 heures d'incorporation en l'absence d'actinomy-

cine, on peut dénombrer 10 à 25 coups par noyau, suivant le stade. Si l'incorporation a été faite en présence de l'antibiotique, le nombre de traces est réduit à peu près de moitié entre les stades 8-9 et 21 et d'environ 70 % au stade 27. L'inhibition est plus forte après 20 heures de traitement par l'actinomycine : elle passe de 70-80 % au cours de la gastrulation à 90 % au stade 27.

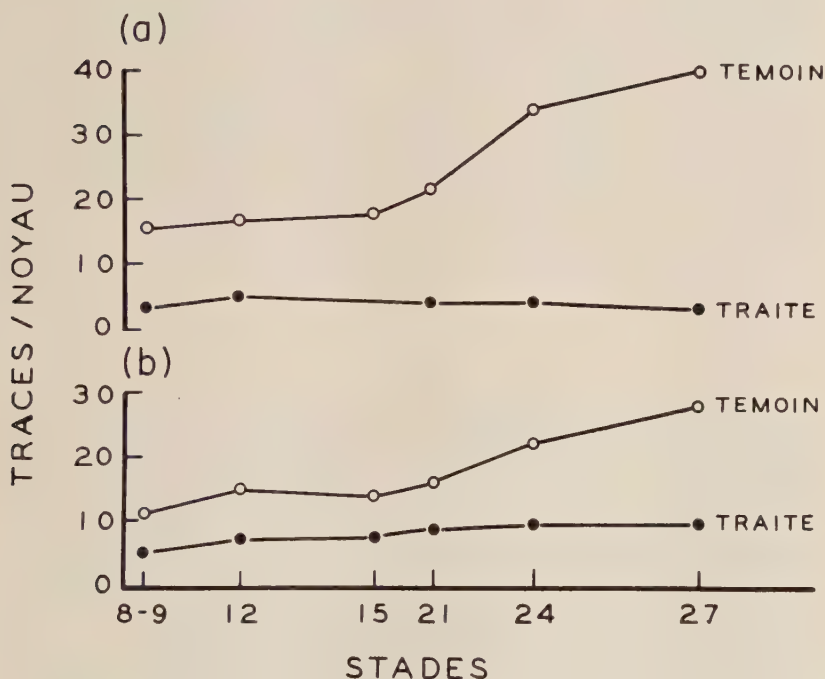


FIGURE 4.

Influence de l'actinomycine sur l'incorporation d'uridine tritiée dans les noyaux somitiques. Six heures (b) et 20 heures (a) d'incorporation en présence et en l'absence d'actinomycine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Il importe de noter que, dans les explantats ayant subi un contact prolongé avec l'antibiotique, la partie mésodermique est en beaucoup meilleur état que la partie nerveuse. Dans certains explantats provenant d'embryons âgés, le tube neural s'est désagrégé en grande partie et ne laisse subsister que la chorde et les somites, dont la face supérieure apparaît ainsi dénudée.

Radioactivité cytoplasmique.

Un marquage cytoplasmique s'instaure dans le mésoderme au cours de la gastrulation. Son intensité s'accroît pendant l'ontogénèse, mais n'est jamais aussi intense que dans le tissu nerveux. Le traitement à l'actinomycine diminue la radioactivité du cytoplasme, mais ne semble pas la supprimer tout à fait.

2.3 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LE TISSU VÉGÉTATIF DE LA GASTRULA ET DANS L'ENDODERME.

Radioactivité nucléaire.

Les noyaux endodermiques ont une radioactivité moins forte que ceux du mésoderme et du tissu nerveux (fig. 5). Le marquage nucléaire est si faible, après 6 heures d'incorporation, qu'il est

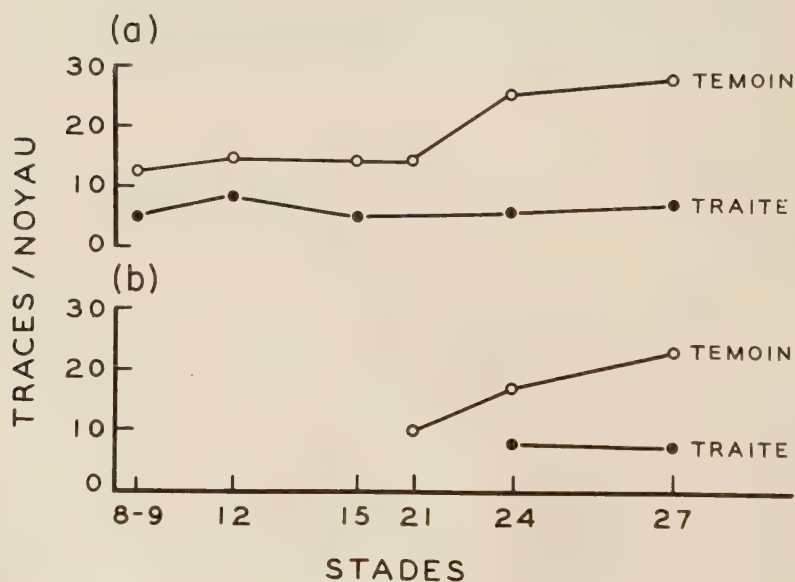


FIGURE 5.

Influence de l'actinomycine sur l'incorporation d'uridine tritiée dans les noyaux endodermiques. Six heures (b) et 20 heures (a) d'incorporation en présence et en l'absence d'actinomycine (10 μ g/ml).

impossible de l'évaluer avec quelque précision avant le stade 21, en particulier quand les cellules ont été traitées à l'actinomycine. Aux stades 24 et 27, l'antibiotique réduit d'environ 50 % en 6 heures la radioactivité des noyaux.

Les noyaux sont mieux marqués après 20 heures de séjour dans le traceur, surtout après la fin de la neurulation. L'actinomycine réduit de manière croissante la radioactivité nucléaire à mesure que les tissus vieillissent : l'inhibition passe de 40 % au cours de la gastrulation à 75 % au stade 27. Les figures 6 et 7 illustrent l'effet d'un séjour de 20 heures dans l'actinomycine sur le marquage des noyaux endodermiques. Il convient de noter le peu d'influence qu'a exercé l'antibiotique sur l'aspect des deux noyaux visibles sur la figure 7. Ceux-ci sont encore assez fortement colorés à l'UNNA et n'ont pas du tout l'aspect turgescent que l'on observe dans les tissus dorsaux traités à l'actinomycine.

Radioactivité cytoplasmique.

Jusqu'au dernier stade examiné (27), aucune radioactivité notable n'a été observée dans le cytoplasme des cellules endodermiques, aussi bien en l'absence qu'en présence d'actinomycine (fig. 6 et 7).

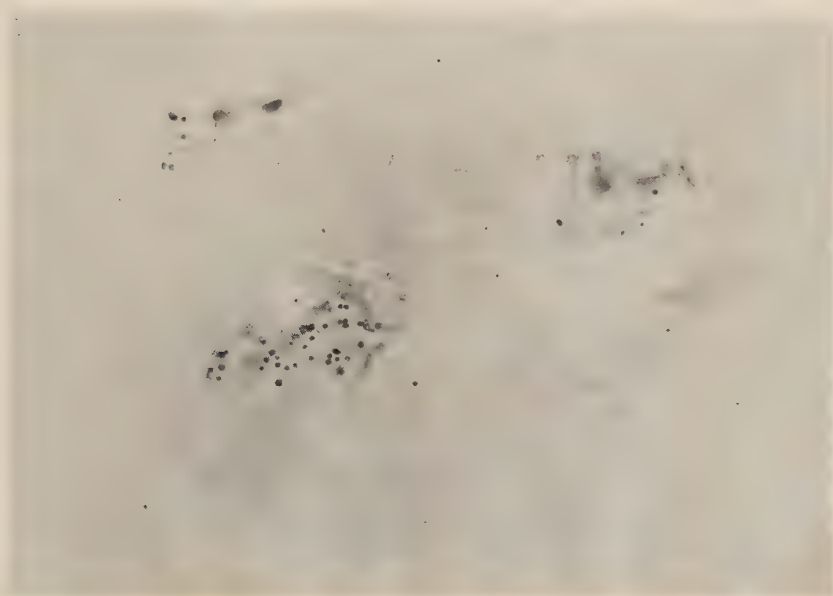


FIGURE 6.

Endoderme de stade 24 mis au contact d'uridine tritiée (10 μ C/ml) pendant 20 heures. Coupe à 10 μ couverte d'émulsion K2 et exposée pendant 28 jours. Le seul noyau visible sur la photographie est assez fortement marqué. Incorporation cytoplasmique nulle. Grossissement : $\times 1.080$.

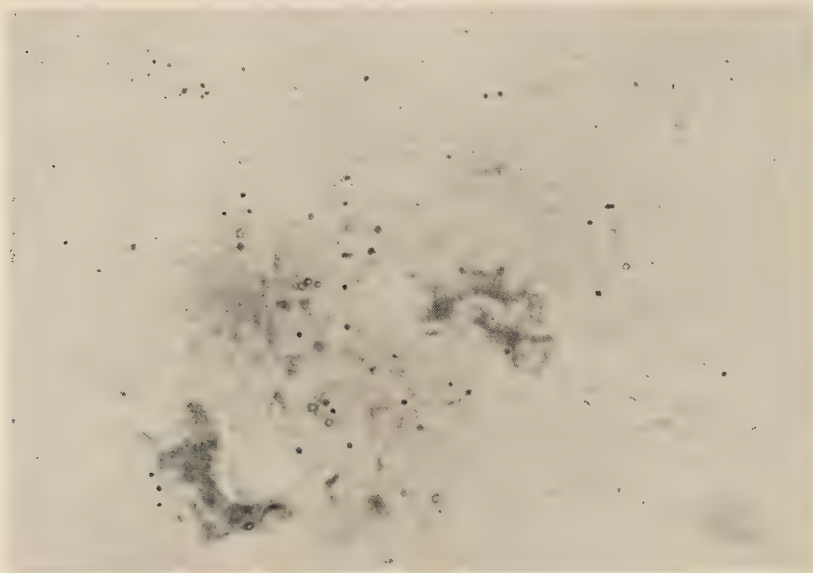


FIGURE 7.

Même tissu que sur la figure 6 mis au contact d'uridine tritiée (10 μ C/ml). Incorporation nucléaire et cytoplasmique nulle. Les nucléoles ne sont pas visibles. Grossissement : $\times 1.080$.

2.4 PROPORTION D'URIDINE INCORPORÉE DANS LE RNA ET DANS LE DNA.

La comparaison des coupes digérées à la RNase et à la DNase permet de se rendre compte de la proportion d'uridine incorporée dans le DNA et le RNA. En général, le nombre de traces nucléaires décelées après une incubation de 1 heure à 37 °C dans un tampon de pH 7,5 est à peu près égal (à ± 20 % près) au total du nombre de coups qui subsistent après une digestion à la RNase et une digestion à la DNase.

L'uridine s'incorpore dans le RNA et le DNA suivant un rapport qui varie d'un tissu à l'autre et d'un stade de développement à l'autre. Au début de la gastrulation, les noyaux incorporent le nucléoside en proportion d'autant plus élevée dans le RNA et en proportion d'autant plus faible dans le DNA qu'ils sont d'origine plus animale (fig. 8). Dans la suite du développement, de plus en plus d'uridine s'incorpore dans le RNA et de moins en moins dans le DNA ; mais les tissus ventraux continuent, plus que les tissus dorsaux, à utiliser le précurseur pour la synthèse du DNA. Il faut noter que les données de la figure 8 représentent la moyenne des

comptages effectués sur un grand nombre de noyaux. Une répartition égale du nombre de coups entre le RNA et le DNA ne signifie pas que le noyau a utilisé un nombre égal de molécules d'uridine pour la synthèse de chaque acide nucléique. Comme le suggère la

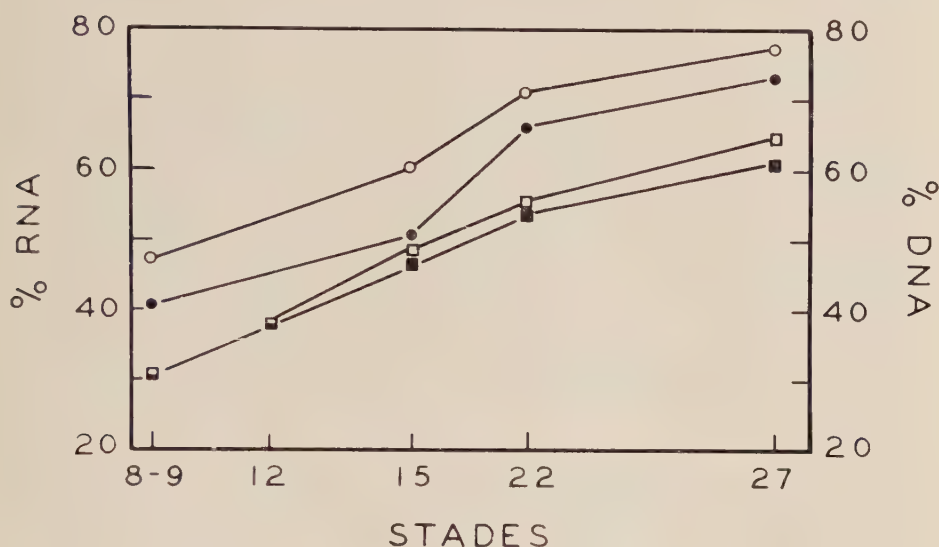


FIGURE 8.

Proportion d'uridine tritiée incorporée dans le RNA et le DNA nucléaires de 4 tissus en cours de différenciation. O—O : ectoderme neural ; ●—● : mésoderme ; □—□ : épiderme ; ■—■ : endoderme. Le pourcentage du nombre de coups incorporés dans le RNA et dans le DNA est donné par le rapport du nombre de traces subsistant après une digestion à la DNase et après une digestion à la RNase.

comparaison des coupes digérées à la RNase et à la DNase, il est plus vraisemblable que les cellules incorporent le précurseur soit dans le RNA, soit dans le DNA, mais pas dans les deux acides nucléiques à la fois. La proportion globale d'uridine qui s'incorpore dans le RNA et le DNA dépendrait donc du nombre de noyaux qui utilisent le précurseur pour la synthèse de l'un ou de l'autre acide nucléique.

Il serait important de savoir dans quelle mesure la synthèse de chacun des acides nucléiques est affectée par l'actinomycine. Pour le déterminer, il aurait fallu étudier comment se répartissent, entre le RNA et le DNA, les traces nucléaires dénombrées après une incorporation en présence de l'antibiotique. En raison de la

très faible radioactivité des noyaux après un traitement à l'actinomycine, cette évaluation n'a pu être faite de façon systématique. Toutefois, dans les quelques cas où la distribution des traces entre le RNA et le DNA a pu être déterminée, le marquage nucléaire subsistant après un séjour de 6 heures dans l'actinomycine était dû presque entièrement au DNA.

3. DISCUSSION.

Les résultats qui viennent d'être décrits montrent que l'actinomycine agit sur les cellules embryonnaires comme un puissant inhibiteur de la synthèse des acides nucléiques. L'inhibition produite par l'antibiotique est plus forte dans les tissus dorsaux que dans les tissus ventraux. Cette différence va de pair avec une résistance meilleure des tissus ventraux à des traitements prolongés à l'actinomycine. En 24 heures, cette dernière provoque une désagrégation partielle de l'ectoderme. L'endoderme, de son côté, résiste pendant plusieurs jours à une dose d'actinomycine de 10 μ g/ml.

Si, comme il est probable, l'uridine ne s'incorpore en présence d'actinomycine que dans le DNA, cela signifie que la synthèse du RNA est totalement bloquée par l'antibiotique et que celle du DNA ne l'est que partiellement. Bien que cette conclusion ne repose que sur des observations faites dans des conditions difficiles (faible marquage nucléaire), elle concorde très bien avec les données de la littérature : KIRK (1960), GOLDSTEIN, SLOTNICK et JOURNEY (1960), HARBERS et MUELLER (1962), HURWITZ, FURTH, MALAMY et ALEXANDER (1962), HURWITZ et AUGUST (1963), PERRY (1963) et REICH (1961), ont constaté également que l'actinomycine inhibe beaucoup moins la synthèse du DNA que celle du RNA. Cette dernière peut être totalement arrêtée alors que les nucléosides continuent à s'incorporer dans le DNA (REICH, FRANKLIN et TATUM, 1962).

La sensibilité plus grande de la polymérase du RNA à l'actinomycine explique pourquoi la radioactivité nucléaire est plus affectée par l'antibiotique dans les tissus âgés que dans les tissus jeunes (fig. 1, 4 et 5). En effet, à mesure que le développement progresse, le précurseur est utilisé en proportion de plus en plus grande pour la synthèse du RNA (fig. 8). D'un stade de développement à l'autre, de moins en moins d'uridine s'incorpore dans le DNA et échappe à l'action inhibitrice de l'antibiotique.

Le passage d'une activité essentiellement mitotique (clivage)

à une phase où la différenciation débute (gastrulation) s'accompagne d'un changement progressif dans le métabolisme nucléique des cellules embryonnaires. Au cours de la segmentation, l'uridine tritiée marque uniquement le DNA (BIELIAVSKY et TENCER, 1960). A partir de la gastrulation, le précurseur commence à s'incorporer dans le RNA aussi bien cytoplasmique que nucléaire. Nos résultats confirment ceux des auteurs précités et permettent de préciser que le marquage du RNA par l'uridine, de même que le marquage cytoplasmique, s'instaurent suivant le gradient dorso-ventral décrit par BRACHET (1943). Dès la fin de la gastrulation, le cytoplasme de la future plaque neurale est nettement plus radioactif que celui du toit de l'archenteron et, surtout, que celui de l'endoderme. En outre, la proportion d'uridine qui pénètre dans le RNA est plus élevée dans la partie dorsale que dans la partie ventrale de l'embryon (fig. 8). Cette double différence entre les tissus dorsaux et ventraux se maintient jusqu'au dernier stade examiné (27). Les ébauches en différenciation active sont donc caractérisées par une synthèse de RNA prépondérante et par un marquage du RNA cytoplasmique.

Les expériences présentes ne peuvent pas déterminer la nature du RNA dont la synthèse est fortement inhibée par l'actinomycine dans les cellules embryonnaires. Il pourrait s'agir du RNA messenger. Mais il est possible que l'influence de l'actinomycine s'exerce aussi bien sur la synthèse du RNA de forme stable (sRNA et rRNA) que sur celle du RNA messenger. Seules des expériences biochimiques pourraient confirmer cette supposition.

4. CONCLUSION.

Dans tous les tissus embryonnaires, l'actinomycine inhibe fortement la synthèse des acides nucléiques et plus spécialement celle du RNA. L'inhibition a tendance à croître au cours du développement et elle est plus marquée dans les tissus animaux et dorsaux que dans les tissus végétatifs ou ventraux. Il n'est pas possible de préciser la nature du RNA dont la synthèse est inhibée par l'actinomycine. Il pourrait s'agir du mRNA. Mais il se peut que l'influence de l'antibiotique s'exerce aussi sur la synthèse du sRNA et du rRNA. La méthode employée ne permet pas d'obtenir de précision sur ce point.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

L'influence inhibitrice exercée par l'actinomycine sur la synthèse du RNA devrait se répercuter sur la synthèse protéique et supprimer cette dernière dans un délai plus ou moins court. Nous rechercherons dans quelle mesure et avec quel retard le blocage du DNA par l'actinomycine inhibe la synthèse protéique chez les embryons de pleurodèle. La rapidité de l'inhibition produite par cet antibiotique devrait nous renseigner sur l'importance du contrôle exercé par les noyaux embryonnaires sur la synthèse des protéines.

1. MÉTHODES.

Prélèvement des fragments de tissu et exposition au traceur.

Comme pour l'étude autoradiographique, l'imperméabilité des œufs entiers vis-à-vis des traceurs nous a obligé à travailler en explantat. Les tissus suivants ont été prélevés comme décrit précédemment :

— *au stade 6* (blastula) : ectoderme présomptif ;

— *au stade 8-9* (jeune gastrula) :

- 1) ectoderme présomptif + lèvres dorsale du blastopore ;
- 2) endoderme présomptif ;

— *au stade 15* (jeune neurula) :

- 1) plaque neurale + toit de l'archenteron ;
- 2) endoderme ;

— *au stade 22* (neurula avancée) :

- 1) tube neural + axe chordo-somitique ;
- 2) endoderme.

L'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines solubles a été suivie après exposition des tissus à l'actinomycine pendant des durées variables et comparée à l'incorporation obtenue en l'absence d'antibiotique. Pour chaque expérience, 40 embryons du même stade sont nécessaires. Ces embryons sont disséqués stérilement de manière à fournir 40 fragments de tissu identiques. De ces 40 fragments, 20 sont cultivés dans du milieu de NIU et TWITTY normal (témoins). Les 20 autres sont placés dans la même solution additionnée d'actinomycine à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ (traités). Ces deux lots sont eux-mêmes partagés en 4 groupes de 5 explantats, qui reçoivent chacun une impulsion de dl-leucine tritiée (20 $\mu\text{C/ml}$; activité spécifique : 107 millicuries par millimole) d'une durée de 3 heures. Ces impulsions sont données 0, 5, 14 et 21 heures après le début de la mise en culture. A la fin de chaque impulsion, les 5 fragments traités et les 5 fragments-témoins sont lavés 3 fois dans un grand excès de solution isotonique (NaCl 0,65 %, ajusté à pH 7 par un tampon tri-maléate), puis prélevés dans 0,2 ml de cette même solution. Les échantillons sont immédiatement congelés à -20°C et gardés à cette température jusqu'à la fin de l'expérience.

Extraction des protéines et mesure de la radioactivité.

Tous les échantillons d'une même expérience sont ramenés simultanément à la température ordinaire, homogénéisés et centrifugés pendant 5 minutes à 12.500 g. Le surnageant fourni par chaque échantillon est appliqué sur une rondelle de papier Whatman n° 3 MM (diamètre : 2,4 cm). Le culot est ensuite resuspendu dans 0,2 ml de NaCl 0,65 % et centrifugé de nouveau. Le second surnageant est également appliqué sur la rondelle de papier et l'opération est renouvelée une troisième fois. Le dernier culot est conservé à -20°C ; il servira pour le dosage des protéines.

Les rondelles de papier portant les extraits de tissus embryonnaires sont traitées suivant la technique de MANS et NOVELLI (1961), qui consiste à éliminer successivement l'acide aminé non incorporé, les acides nucléiques et les lipides, pour ne garder finalement que les protéines sur la matrice cellulosique. Le traitement comporte les étapes suivantes :

- 1) séchage rapide à l'air chaud ;
- 2) fixation du TCA 10 % additionné de dl-leucine- C^{12} 0,1 M : une nuit ;
- 3) lavage au TCA 5 % : 15 min

- 4) extraction au TCA 5 % chaud (90 °C) : 30 minutes ;
- 5) lavage au TCA 5 % froid ;
- 6) extraction à l'alcool-éther tiède (37 °C) : 30 minutes ;
- 7) lavage à l'alcool-éther froid ;
- 8) lavage à l'éther pur : 15 minutes ;
- 9) séchage à l'air.

La radioactivité des rondelles de papier est alors mesurée au moyen d'un appareil à scintillation liquide. Les « blancs » consistent, d'une part, en des rondelles de papier Whatman non chargées d'extrait et, d'autre part, en des rondelles chargées de 10 μ l de la solution d'incorporation (leucine- H^3 , 20 μ C/ml). Les « blancs » de l'un et l'autre type sont soumis à la même suite de traitements que les rondelles expérimentales.

La radioactivité obtenue en coups par minute doit être ramenée à une quantité connue de protéine. En effet, la taille des fragments de tissu prélevés par micro-dissection n'est pas nécessairement la même dans les séries-témoins et dans les séries traitées. Nous avons mesuré au moyen du réactif de FOLIN (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL, 1951) la quantité de tyrosine obtenue par hydrolyse alcaline à partir des culots de centrifugation. La couleur développée est comparée à celle que donne un étalon de tyrosine. Durant la période de développement étudiée, la plus grande partie des protéines insolubles est formée par du vitellus. Or celui-ci n'est résorbé que très lentement pendant la période de l'ontogenèse qui nous concerne (DENIS, 1961). D'autre part, il est peu vraisemblable que le traitement à l'actinomycine affecte d'une manière quelconque la richesse des cellules en vitellus, ainsi que la composition en acides aminés de celui-ci. La quantité de vitellus constitue donc une référence stable pour l'estimation de la quantité de tissu prélevé dans les séries-témoins et dans les séries traitées. Cette référence n'est évidemment valable que pour la comparaison de tissus de même origine (dorsale ou ventrale), donc également riches en vitellus.

La radioactivité brute de chaque échantillon doit subir 2 corrections successives. Il faut d'abord lui soustraire le nombre moyen de coups fournis par les « blancs ». La radioactivité de ceux-ci (40-60 coups par rondelle) ne diffère pas de manière sensible suivant qu'ils ont été ou non chargés d'acide aminé marqué. Le nombre net de coups obtenu par échantillon est ensuite ramené à une même quantité de protéine (100 μ g de tyrosine dans le culot).

2. RÉSULTATS.

Les résultats seront présentés de façon succincte, en tenant compte seulement du niveau d'inhibition obtenu après 24 heures d'exposition à l'actinomycine. Dans la plupart des cas, l'antibiotique commence à influencer la synthèse protéique déjà après 8 heures de traitement. L'inhibition croît de façon à peu près linéaire pendant toute la durée de l'exposition à l'actinomycine.

2.1 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LES TISSUS ECTO-MÉSODERMIQUES.

A mesure que le développement progresse, l'actinomycine exerce une inhibition croissante sur la synthèse protéique (fig. 9). Il faut noter que dans l'ecto-mésoderme, la synthèse des protéines ne devient importante qu'à partir du début de la gastrulation. L'incorporation de la leucine tritiée en présence d'actinomycine

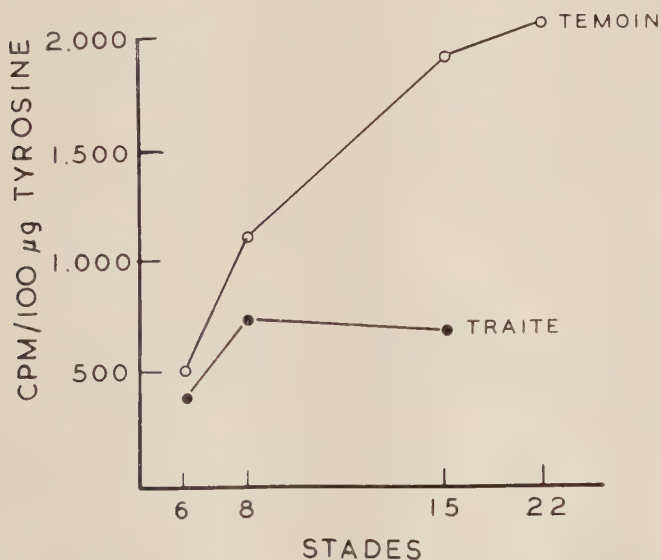


FIGURE 9.

Influence de l'actinomycine sur l'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines solubles des tissus ecto-mésodermiques (ectoderme présomptif + lèvres dorsales du blastopore ; plaque neurale + toit de l'archenteron ; tube nerveux + axe chordo-somitique). Les tissus traités ont été exposés pendant 24 heures en tout à l'actinomycine (10 µg/ml) et, pendant les 3 dernières heures de traitement, à la leucine tritiée (20 µC/ml). Les témoins ont été cultivés pendant 21 heures en milieu normal, puis exposés pendant 3 heures à la leucine tritiée.

n'a pas pu être suivie au-delà du stade jeune neurula par suite de difficultés techniques. Beaucoup d'explantats formés du tube neural et de l'axe chordo-somitique de la neurula avancée se recouvrent rapidement d'épiderme. Dans ces conditions, la pénétration du traceur devient très aléatoire. De fait, certains explantats incorporent une quantité notable de leucine tritiée, tandis que certains autres sont à peine marqués. Il est, par conséquent, impossible de mesurer au stade neurula avancée, l'incorporation de la leucine tritiée en présence et en l'absence d'actinomycine.

2.2 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LE TISSU ENDODERMIQUE.

L'actinomycine inhibe la synthèse protéique de manière croissante au cours de la gastrulation et de la neurulation (fig. 10).

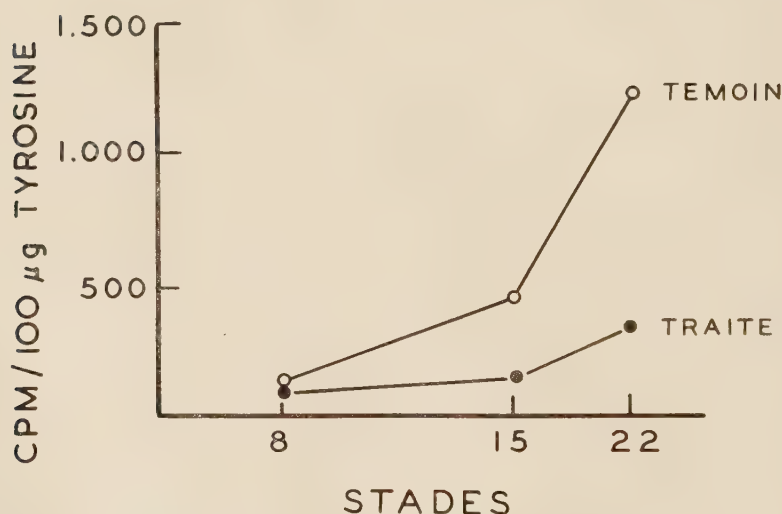


FIGURE 10.

Influence de l'actinomycine sur l'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines solubles du tissu endodermique. Mêmes conditions que sous la figure 9.

Dans l'endoderme, l'incorporation de la leucine dans les protéines ne devient importante que vers la fin de la neurulation. La synthèse protéique commence donc dans les tissus ventraux avec un retard notable sur les tissus dorsaux.

2.3 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE.

Dans le système que nous avons utilisé, le précurseur marqué doit franchir la barrière des membranes cellulaires avant de pouvoir s'incorporer dans les protéines. Toute réduction de la radioactivité pourrait donc être attribuée autant à une influence de l'antibiotique sur la perméabilité cellulaire qu'à un effet sur la synthèse protéique elle-même.

L'action de l'actinomycine sur la pénétration du traceur dans les cellules embryonnaires a été étudiée de la façon suivante. Un groupe de 5 fragments d'endoderme (stade 22) est mis au contact de leucine- H^3 (20 $\mu C/ml$) durant 24 heures. Un autre groupe, prélevé dans les mêmes conditions, est cultivé pendant la même période en présence du traceur et d'actinomycine (10 $\mu g/ml$). Chaque série d'explantats est lavée 3 fois pendant 5 minutes dans 10 ml de milieu de culture normal, puis extraite 3 fois de suite dans 0,2 ml de TCA 10 % froid. Les 3 surnageants successifs sont appliqués sur une rondelle de papier Whatman, puis séchés à l'air chaud. La radioactivité de l'extrait au TCA est ramenée à une même quantité de protéine (100 μg de tyrosine dans le culot). L'expérience montre que le traitement à l'actinomycine n'affecte pas sensiblement la radioactivité du pool des acides aminés. L'antibiotique ne semble donc avoir aucune influence notable sur la perméabilité cellulaire vis-à-vis de la leucine. Ce résultat a été confirmé à plusieurs reprises.

3. DISCUSSION.

L'influence exercée par l'actinomycine sur la synthèse protéique est beaucoup moins rapide que l'effet produit sur la synthèse du RNA. Après un jour de contact avec l'actinomycine, la synthèse des protéines se poursuit à un rythme ralenti, alors que l'uridine ne s'incorpore pratiquement plus dans le RNA. Par la résistance relativement élevée de leur synthèse protéique vis-à-vis de l'actinomycine, les cellules embryonnaires se rapprochent plus des tissus différenciés des Vertébrés supérieurs (réticulocytes, fibroblastes en culture) que des Bactéries. Chez celles-ci, l'actinomycine réduit très rapidement (après quelques minutes) l'incorporation des acides aminés dans les protéines (LEVINTHAL, KEYNAN et HIGA, 1962). Dans les tissus de Mammifère et d'Oiseau, par contre, la synthèse des protéines n'est inhibée que lentement par l'antibiotique (GOLDSTEIN et al. 1960 ; DAVIDSON, ALLFREY et MIRSKY, 1963 ; SHATKIN, 1963 ; PENMAN, SCHERRER, BECKER

et DARNELL, 1963 ; REVEL et HIATT, 1964 ; WILT, 1965 ; BLOOM, GOLDBERG et GREEN, 1965).

L'inhibition exercée par l'actinomycine sur la synthèse protéique est particulièrement lente en fin de segmentation et au début de la gastrulation (fig. 9 et 10). Ceci pourrait signifier que, jusqu'à ce moment, la synthèse protéique est soutenue par un mRNA relativement stable. La présence d'un mRNA stable durant la période pré-gastruléenne n'est certainement pas à exclure chez les Echinodermes, si l'on considère le peu d'influence qu'exerce l'actinomycine sur le clivage des œufs d'oursins et, en particulier, sur la synthèse protéique durant cette période (GROSS et COUSINEAU, 1963, 1964 ; GROSS, MALKIN et MOYER, 1964). La même possibilité existe chez les Amphibiens, où les noyaux n'exercent un rôle morphogénétique véritable qu'à partir du début de la gastrulation (BRACHET, 1962) et où la segmentation demeure elle aussi insensible à l'actinomycine (BRACHET et DENIS, 1963).

Le début de la gastrulation est marqué non seulement par une forte augmentation de la synthèse protéique, mais encore par une sensibilité accrue de celle-ci vis-à-vis de l'actinomycine (fig. 9). Ceci montre que le contrôle exercé par les noyaux sur la synthèse des protéines s'instaure et s'accroît au cours des mouvements morphogénétiques (stades 8-22). Ce contrôle pourrait s'exercer par une synthèse accélérée de mRNA, lequel, en se fixant sur les ribosomes, lèverait le blocage de ces derniers, qui s'établit en fin d'oogenèse et persiste jusqu'à la fin du clivage (BRACHET, 1962). Cette supposition sera confirmée par la suite.

4. CONCLUSION.

L'actinomycine inhibe lentement la synthèse des protéines solubles dans les cellules de la blastula et de la jeune gastrula. L'inhibition devient plus rapide dans la suite du développement (gastrulation et neurulation).

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA COMPÉTENCE DE L'ECTODERME ET SUR LE POUVOIR INDUCTEUR DE LA LÈVRE BLASTOPORALE

Les expériences décrites jusqu'à présent montrent que l'actinomycine agit sur les cellules embryonnaires comme un puissant inhibiteur de la synthèse du RNA. La synthèse protéique est également affectée par l'antibiotique, mais avec un certain retard. Pareil décalage n'a pas de quoi étonner : il est commun à toutes les cellules d'organismes multicellulaires. Quand la production du RNA s'est arrêtée, la synthèse protéique est soutenue pendant un certain temps par le mRNA qui existait avant le début de l'inhibition. On peut donc arrêter au moyen de l'actinomycine la transcription de l'information génétique sous forme de RNA d'abord, sous forme de protéine ensuite. Les effets de cette suspension sur la différenciation primaire seront à présent examinés. Comme annoncé précédemment, on étudiera au moyen de fragments de tissus combinés en explantats (sandwiches) l'influence de l'actinomycine sur la neuralisation de l'ectoderme.

1. MÉTHODE.

Les embryons ont été disséqués comme décrit plus haut. Les explantats (sandwiches) sont constitués de 3 fragments de tissu fournis par 3 embryons de même stade (8 a-b ; jeune gastrula). Deux lambeaux d'ectoderme présomptif, provenant de la calotte animale de jeunes gastrulas, forment l'enveloppe du sandwich. Entre ces deux fragments, on place le tissu inducteur prélevé sur la lèvre dorsale du blastopore. Après cicatrisation parfaite, les explantats sont transférés dans un nouveau récipient à fond d'agar et cultivés à 18-20 °C pendant 4 jours au maximum dans du milieu

de NIU et TWITTY. Les explantats sont alors fixés au ZENKER, coupés à 10 μ et colorés à l'UNNA (BRACHET, 1953). Quelques séries ont été colorées alternativement à l'UNNA et au FEULGEN.

2. CRITÈRES D'IDENTIFICATION DU TISSU NERVEUX.

La neuralisation de l'ectoderme qui constitue l'enveloppe des sandwiches peut s'observer de l'extérieur par la formation de plaques neurales. Celles-ci se creusent rapidement en gouttières et se ferment après environ 3 jours de culture. En coupe, les plaques neurales ont un aspect semblable à celles que l'on peut observer dans les embryons en train de neuruler. L'ectoderme y est fortement épaissi ; il présente un aspect palissadique et ses noyaux, très nombreux, sont intensément colorés à l'UNNA. Les tubes neuraux ressemblent par leur structure à une moelle épinière normale. Les cellules y sont allongées et serrées les unes contre les autres, de telle sorte que leur grand axe est orienté vers la lumière du tube. A certains endroits, la paroi des cavités neurales se distend pour former un voile dont l'aspect évoque les formations choroïdiennes visibles dans le cerveau postérieur des embryons normaux. Toutes les structures neurales présumées sont toujours au contact de tissus d'origine mésodermique, reconnaissables à leur richesse en vitellus et à leur pauvreté en pigment. Dans aucun cas, la formation de substance blanche (fibres nerveuses) n'a été constatée. La durée de culture n'était pas suffisante pour que la différenciation puisse progresser aussi loin. Le tissu nerveux en formation sera donc identifié uniquement par des critères morphologiques, basés sur la ressemblance des structures observées avec celles de l'embryon normal.

3. RÉSULTATS.

Près de 300 sandwiches ont été mis en culture, se répartissant en 4 types d'expériences différents.

3.1 PREMIÈRE EXPÉRIENCE : INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA DIFFÉRENCIATION DES SANDWICHES CULTIVÉS TOUT ENTIERS DANS L'ANTIBIOTIQUE.

Les sandwiches, formés de tissus intacts (non traités), sont placés dans l'actinomycine après cicatrisation parfaite (2-4 heures). Ils sont cultivés dans l'antibiotique pendant plusieurs jours. Dans une première série (tableau 1), la dose d'actinomycine varie de 0,6 à 10 μ g par ml. Dans une seconde série (tableau 2), la dose

d'actinomycine demeure inchangée, mais la durée de culture varie de 1 à 4 jours.

TABLEAU 1
*Influence de la concentration de l'actinomycine
sur la différenciation des sandwichs*

Nombre d'expé- riences	Dose d'actinomycine (µg/ml)	Différenciation de l'ectoderme (4 jours de culture)		
		Tissu nerveux abondant	Tissu nerveux peu abondant	Tissu nerveux absent
11	0	11	0	0
4	0,6	4	0	0
4	1,2	3	1	0
3	2,5	1	2	0
9	5	1	5	3
5	10	0	0	5

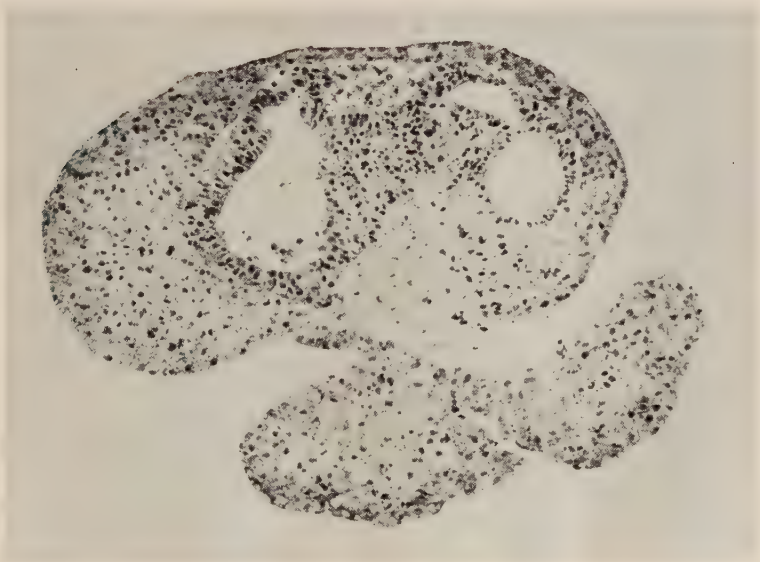


FIGURE 11.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif de jeune gastrula et d'une lèvre dorsale de blastopore. Culture pendant 4 jours dans du milieu de NIU et TWITTY normal. L'enveloppe de l'explantat s'est différenciée en ectoderme atypique (partie inférieure) et en tissu nerveux. Coloration à l'UNNA. Grossissement : × 70.

Le tableau 1 décrit la différenciation observée dans les explantats traités pendant 4 jours par des doses croissantes d'actinomycine. Tous les explantats-témoins contiennent des tubes nerveux bien caractérisés (fig. 11). Il en va de même pour les sandwichs cultivés dans de l'actinomycine à 0,6 µg/ml (fig. 12). Les explantats soumis à des concentrations d'actinomycine de 1,2 à 2,5 µg/ml fournissent plus rarement des structures neurales bien différenciées. Les cas où les sandwichs ne contiennent que des formations nerveuses mal formées ou même aucune trace de tissu nerveux deviennent de plus en plus fréquents. Lorsque la concentration d'actinomycine atteint 10 µg/ml, la différenciation nerveuse est totalement abolie : les sandwichs (fig. 13) sont formés d'un tissu compact et dépourvu de structure. Les noyaux se colorent très peu par le mélange d'UNNA et ils ne présentent pas de nucléoles visibles.

Si l'on suit de jour en jour l'évolution interne des sandwichs cultivés dans de l'actinomycine à 10 µg/ml (tableau 2), on n'aper-

TABLEAU 2

*Influence de la durée de traitement à l'actinomycine
(10 µg/ml) sur la différenciation des sandwichs.*

Nombre d'expériences	Durée de traitement ou de culture (jours)	Différenciation de l'ectoderme			
		Pas de tissu nerveux	Plaques neurales	Gouttières neurales	Tubes nerveux
Témoins					
3	1	3 (*)	0	0	0
7	2	0	7	0	0
2	3	0	0	2	0
11	4	0	0	0	11
Traités					
3	1	3 (*)	0	0	0
6	2	0	6	0	0
3	3	0	0	3	0
5	4	5	0	0	0

(*) Pas encore d'induction.

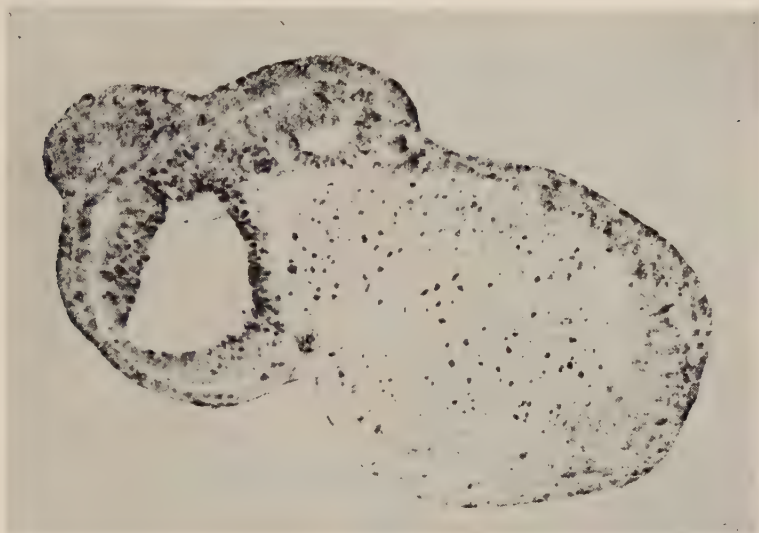


FIGURE 12.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif de jeune gastrula et d'une lèvre dorsale de blastopore. Culture pendant 4 jours dans de l'actinomycine à la concentration de $0,6 \mu\text{g/ml}$. Deux tubes nerveux sont visibles dans la partie gauche de l'explantat. La partie droite renferme un amas de tissu d'origine mésodermique.



FIGURE 13.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif de jeune gastrula et d'une lèvre dorsale de blastopore. Culture pendant 4 jours dans de l'actinomycine à la concentration de $10 \mu\text{g/ml}$. L'explantat présente un aspect non organisé. Noyaux extrêmement peu colorés à l'UNNA.

çoit durant les 72 premières heures de culture aucune différence morphologique importante entre les explantats-témoins et les explantats traités à l'actinomycine. Toutefois, l'étude cytologique fait apparaître une différence croissante entre les sandwiches-témoins et les sandwiches traités, à mesure que la culture se prolonge. Déjà après 24 heures, un retard dans les mitoses se manifeste dans les explantats soumis à l'actinomycine ; la colorabilité des noyaux à l'UNNA et surtout celle des nucléoles est réduite par rapport aux témoins. Cette tendance s'accroît après 2 et 3 jours de culture. Les gouttières neurales qui apparaissent après 72 heures de séjour dans l'actinomycine (fig. 14) sont formées de cellules à



FIGURE 14.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif de jeune gastrula et d'une lèvre dorsale de blastopore. Culture pendant 3 jours dans de l'actinomycine à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. Une gouttière neurale en train de se fermer est visible dans la partie droite de l'explantat. Noyaux peu colorés à l'UNNA.

noyaux très pâles, dont beaucoup n'ont plus de nucléoles visibles. Les formations nerveuses qui garnissent les explantats cultivés en milieu normal (fig. 15) présentent des noyaux fortement colorés à l'UNNA et pourvus de nucléoles bien apparents.

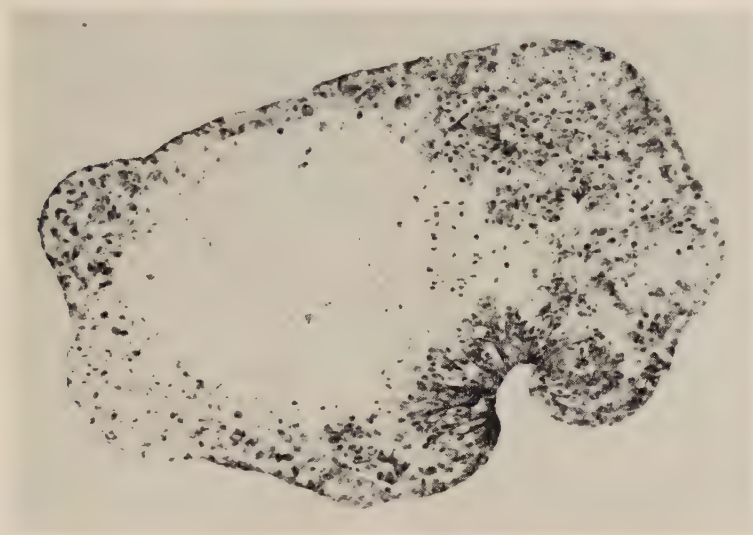


FIGURE 15.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif de jeune gastrula et d'une lèvre dorsale de blastopore. Culture pendant 3 jours en milieu normal. Une gouttière neurale en train de se fermer est visible dans la partie inférieure de l'explantat. Noter la coloration intense des noyaux à l'UNNA, qui contraste avec la pâleur des noyaux traités à l'actinomycine (fig. 14).

Conclusion.

C'est donc seulement au cours de la quatrième journée de culture qu'une différence morphologique décisive apparaît entre les sandwiches-témoins et les sandwiches traités à l'actinomycine. Toutes les structures nerveuses présomptives qui s'étaient formées durant les trois premiers jours disparaissent dans les explantats cultivés en présence de l'antibiotique pour faire place à un tissu compact analogue à l'ectoderme atypique. Cette transformation fait suite à une perte progressive du RNA nucléaire. La disparition des structures nerveuses ne résulte apparemment pas d'une mort lente des cellules. En effet, après 4 jours de culture dans l'actinomycine, les cellules adhèrent encore fermement les unes aux autres et ne montrent pas le moindre signe de pycnose. Seule la faible colorabilité des noyaux distingue le tissu traité à l'actinomycine de l'ectoderme atypique banal.

3.2 DEUXIÈME EXPÉRIENCE : INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA COMPÉTENCE DE L'ECTODERME.

De l'ectoderme compétent de jeune gastrula est traité pendant un temps variable à l'actinomycine (10 µg/ml). Il est ensuite soumis à l'action inductrice d'une lèvres blastoporale intacte. Les résultats de ce type d'expérience sont résumés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Influence de l'actinomycine (10 µg/ml) sur la compétence de l'ectoderme

Nombre d'expériences	Durée de traitement de l'ectoderme	Durée de culture (jours)	Différenciation de l'ectoderme	
			Tissu nerveux présent	Tissu nerveux absent
9	6 h	1	0	9 (*)
4	3 h	1	0	4 (*)
4	1 h 30	1	0	4 (*)
8	45 min	1-2	0	8 (*)
5	22 min	1-2	0	5 (*)
4	11 min	1	0	4 (*)
18	5 min	2-3	4	14
23	2 min 30	2-3	4	19

(*) Tissu en voie de désagrégation.

Les traitements d'une durée comprise entre 6 heures et 45 minutes fournissent des résultats pratiquement identiques : les explantats se désagrègent, en général, après 24 heures de culture, sans que la durée du traitement ait une influence nette sur la durée de la survie. La figure 16 offre un exemple typique de l'état des sandwichs un jour après leur mise en culture. L'explantat se compose essentiellement de cellules détachées ou en train de se détacher les unes des autres. Leur noyau est si peu coloré à l'UNNA qu'il est pratiquement invisible. Les quelques noyaux plus apparents, situés vers le centre du sandwich, sont d'origine mésodermique. La figure 17 est une vue du même explantat coloré au FEULGEN. Les noyaux d'origine ectodermique (parties droite et

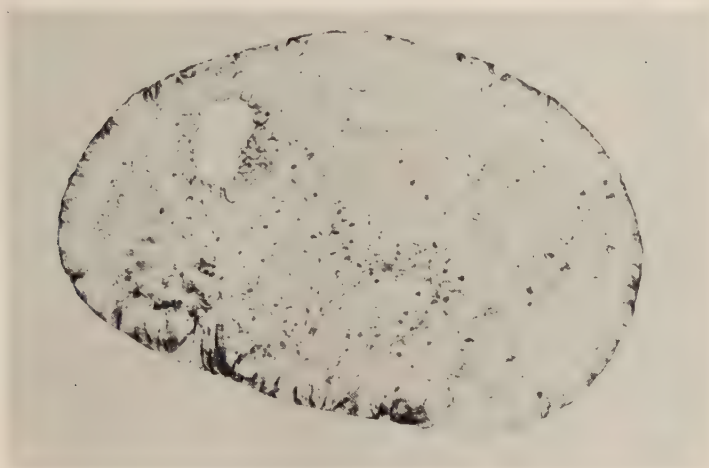


FIGURE 16.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif traité pendant 1 heure 30 à l'actinomycine (10 μ g/ml) et d'une lèvre blastoporale intacte. Culture pendant 28 heures en milieu normal. L'explantat est en voie de désagrégation et des cellules déjà détachées sont visibles dans la partie droite du sandwich. Noyaux pas du tout colorés à l'UNNA. Le groupe de noyaux plus apparents visibles vers le centre de l'explantat provient de la lèvre blastoporale (non traitée).



FIGURE 17.

Même sandwich que sur la figure 16, mais coloré au FEULGEN. Les noyaux les plus pâles, visibles dans les parties gauche et droite de l'explantat, sont d'origine ectodermique. Les noyaux mieux colorés situés au centre proviennent de la lèvre blastoporale (non traitée).

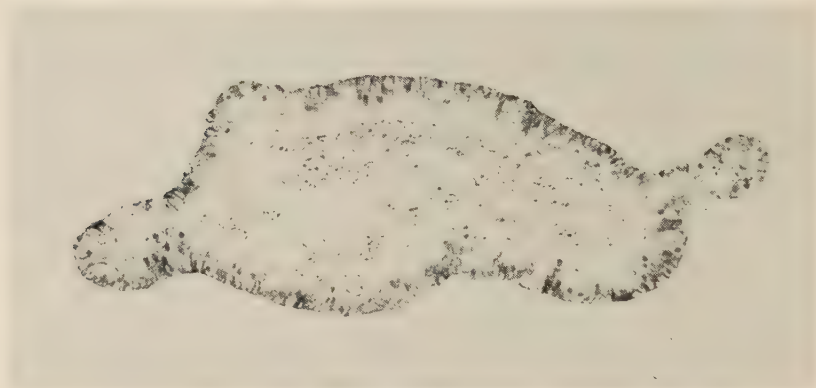


FIGURE 18.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif traité pendant 2 minutes 30 à l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) et d'une lèvre blastoporale intacte. Culture pendant 2 jours en milieu normal. Aucune trace de neurulation dans les parois du sandwich. Noyaux d'origine ectodermique peu colorés à l'UNNA.



FIGURE 19.

Sandwich formé de tissus non traités, cultivé pendant 2 jours en milieu normal. Une plaque médullaire est visible dans la partie droite de l'explantat. Noyaux bien colorés à l'UNNA.

gauche du sandwich) sont plus clairs que les noyaux mésodermiques, qui occupent le centre de l'explantat. A plus fort grossissement, les noyaux traités à l'actinomycine présentent un aspect turgescent et leur chromatine a un aspect réticulé. Retenons encore un arrêt des mitoses : en fait foi le nombre relativement restreint de cellules par sandwich.

Le traitement de l'ectoderme pendant une durée de 11 à 22 minutes provoque une désagrégation du sandwich tout aussi rapide qu'un traitement de durée plus longue. Toutefois, le nombre de cellules par explantat est plus élevé, ce qui indique un arrêt

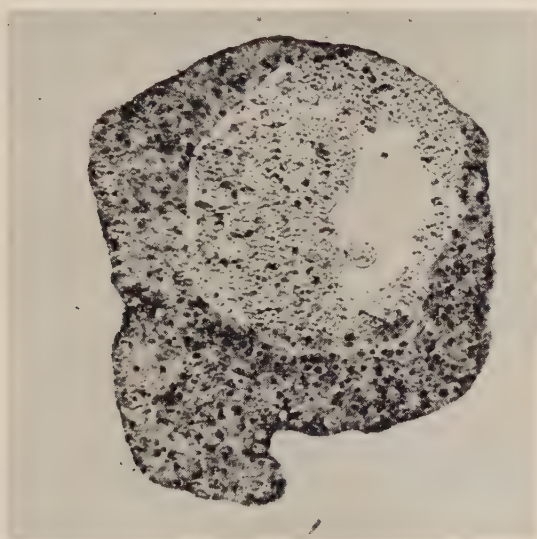


FIGURE 20.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif traité pendant 2 minutes 30 à l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) et d'une lèvre blastoporale intacte. Culture pendant 3 jours en milieu normal. L'enveloppe du sandwich a formé un tissu compact dépourvu d'organisation.

moins précoce des mitoses. Les noyaux d'origine ectodermique (traités) présentent une coloration au FEULGEN aussi intense que les noyaux mésodermiques (non traités). Mais la teneur des cellules en RNA nucléaire demeure très faible, comme le prouve l'extrême pâleur des noyaux après une coloration à l'UNNA.

Si l'ectoderme est traité pendant 5 minutes à l'actinomycine avant d'être mis en sandwich, il peut survivre pendant 2 à 3 jours. Après 48 heures de culture, la plupart des cellules sont en bon

état. Seule une petite quantité d'entre elles s'est détachée et rassemblée dans la cavité du sandwich. Sur 6 explantats fixés après 2 jours de culture, l'ectoderme a formé une plaque médullaire de petites dimensions dans un seul cas. Dans les 12 cas où la culture a été prolongée pendant 3 jours, une neuralisation partielle de l'ectoderme a été observée 3 fois. Parmi les 9 sandwiches restants, 3 étaient en cytolysse partielle et 6 en cytolysse avancée.

Quand le traitement de l'ectoderme est réduit à 2 minutes 30, l'état des cellules demeure excellent après 48 heures de culture. Trois sur 14 sandwiches fixés après 2 jours présentent un épaississement local de l'ectoderme, qui est peut-être une plaque neurale en train de se dessiner. Les 11 autres explantats ont un aspect analogue à celui que montre la figure 18. Les parois du sandwich sont d'épaisseur uniforme et ne manifestent aucune tendance à former une plaque médullaire. Les noyaux des cellules ectodermiques sont plus gros et plus pâles que ceux des sandwiches-témoins (fig. 19), qui montrent des signes évidents de neuralisation. Sur les 9 sandwiches qui ont été maintenus en culture pendant 3 jours, un seul contenait une formation ressemblant à un tube nerveux de petites dimensions. Les 8 autres explantats étaient formés d'ectoderme atypique (fig. 20). Parmi ces derniers, 5 étaient en état de cytolysse assez avancée.

Conclusion.

Le traitement de l'ectoderme compétent par l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) pendant une durée égale ou supérieure à 11 minutes entraîne une désagrégation rapide du tissu. Cette désagrégation s'accompagne d'une disparition presque totale du RNA nucléaire. Un séjour de 2 minutes 30 dans l'actinomycine permet à l'ectoderme de survivre pendant 2 à 3 jours mais empêche dans 80 % des cas la formation de plaques neurales ou de tubes nerveux aux dépens du tissu traité. *En d'autres mots, l'actinomycine supprime la compétence de l'ectoderme.*

3.3 TROISIÈME EXPÉRIENCE : INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LE POUVOIR INDUCTEUR DE LA LÈVRE BLASTOPORALE.

La lèvre dorsale du blastopore est traitée à l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$), puis placée entre deux fragments d'ectoderme intact. Le tableau 4 résume les résultats de ce type d'expérience.

Un traitement de longue durée (24 heures - 6 heures) entraîne après 2 ou 3 jours de culture une cytolysse complète du tissu méso-

dermique et une cytolyse partielle du tissu ectodermique. Si la lèvre blastoporale est traitée pendant 3 heures ou 1 heure 30 par l'antibiotique, seule une partie de ses cellules est cytolysée après 2 à 4 jours. Le reste du tissu implanté se compose de cellules à noyaux extrêmement pâles, qui ont perdu la plus grande partie de leur RNA nucléaire. L'enveloppe du sandwich a formé un tissu compact, à cellules nombreuses, mais d'où toute trace d'organisation est absente.

TABLEAU 4

*Influence de l'actinomycine (10 µg/ml)
sur le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale*

Nombre d'expériences	Durée de traitement de la lèvre blastoporale	Durée de culture (jours)	Différenciation de l'ectoderme	
			Tissu nerveux présent	Tissu nerveux absent
6	24 h	2	0	6 (*)
6	6 h	3	0	6 (*)
4	3 h	2	0	4 (*)
3	1 h 30	4	0	3 (*)
10	45 min	2-3	1	9
4	22 min	2-3	2	2
12	11 min	2-4	8	4
4	5 min	4	4	0
3	0	4	3	0

(*) Tissu en mauvais état.

Parmi les 10 cas où le tissu inducteur avait subi un traitement de 45 minutes à l'actinomycine, l'ectoderme s'est neutralisé dans un cas seulement ; il est demeuré sans organisation dans les 9 autres cas (fig. 21). Si la durée du traitement est progressivement réduite à 22 minutes, puis à 11 minutes et enfin à 5 minutes, la fréquence des neurulations augmente de façon régulière : elle passe de 50 % des cas après 22 minutes de traitement à 66 % après 11 minutes et à 100 % après 5 minutes. Cette évolution s'accompagne d'une amélioration progressive de l'état du tissu inducteur : la proportion de cellules lysées diminue lorsque le traitement à l'actinomycine devient plus court. Il existe une corrél-

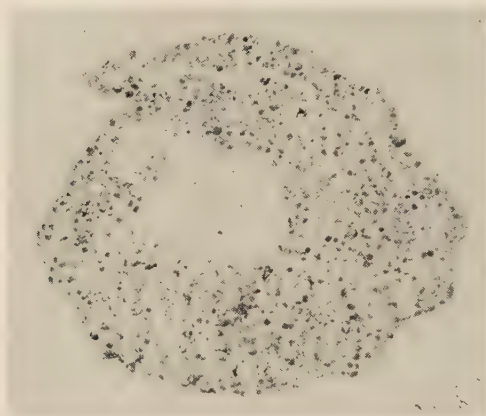


FIGURE 21.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif intact et d'une lèvre blastoporale traitée pendant 45 minutes à l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$). Culture pendant 3 jours en milieu normal. L'enveloppe du sandwich a formé un tissu compact dépourvu d'organisation.

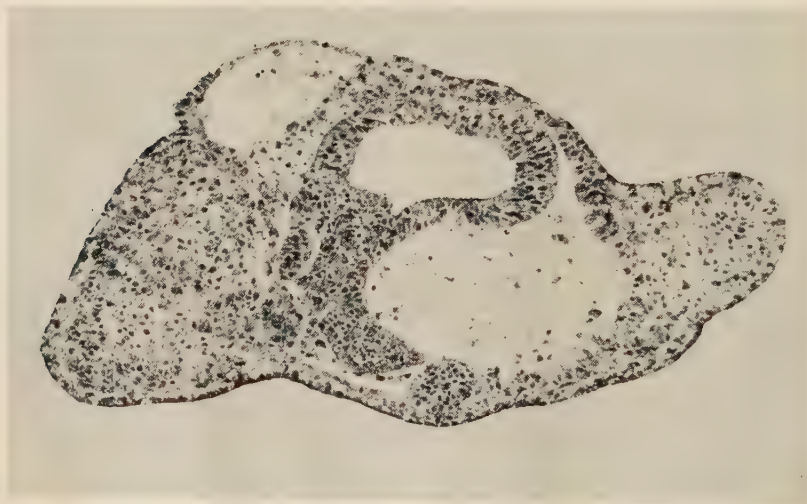


FIGURE 22.

Sandwich formé d'ectoderme présomptif intact et d'une lèvre blastoporale ayant séjourné pendant 3 heures dans le milieu de culture normal. Culture pendant 4 jours en conditions normales. Une formation nerveuse de grandes dimensions occupe toute la partie centrale de l'explantat. A son contact, tissu d'origine mésodermique.

lation nette entre l'aspect des cellules mésodermiques et la différenciation observée dans l'ectoderme : dans les cas où celui-ci a commencé à se neuraliser, les cellules mésodermiques présentent une coloration à l'UNNA d'intensité normale et elles se différencient en corde, somites et mésenchyme, si la culture est de durée suffisante (4 jours). Chaque fois que l'ectoderme ne présente aucune trace de neuralisation, le tissu mésodermique est formé, en majeure partie, de cellules à noyau très faiblement coloré par le mélange d'UNNA.

Un séjour de 3 heures dans le milieu de culture normal n'affecte pas le pouvoir inducteur de la lèvre dorsale du blastopore (fig. 22). L'absence de formations nerveuses dans les sandwiches après un traitement de la lèvre blastoporale à l'actinomycine doit donc être attribuée à l'action de l'antibiotique et non à une éventuelle perte de l'agent inducteur dans le milieu de culture.

Conclusion.

Le traitement de la lèvre blastoporale par l'actinomycine pendant une durée égale ou supérieure à 1 heure 30 entraîne l'absence totale de formations nerveuses dans le sandwich. Si la durée du traitement est réduite de moitié en moitié, jusqu'à 5 minutes, la fréquence des neurulations augmente régulièrement jusqu'à atteindre 100 % des cas. Chaque fois que, après un traitement court, la lèvre dorsale n'a induit aucune structure nerveuse dans l'ectoderme placé à son contact, on observe une modification cytologique profonde des cellules inductrices : leur noyau est très faiblement coloré à l'UNNA. *L'abolition du pouvoir inducteur va donc de pair avec une disparition de RNA nucléaire.*

Toutefois, le tissu mésodermique traité à l'actinomycine pendant 45 minutes ou plus subit une cytolysse plus ou moins complète, qui commence 48 heures après la mise en culture. La présence de cellules pycnotiques à l'intérieur de l'explantat pourrait exercer un effet défavorable sur la différenciation des parois du sandwich. Dans certains cas, elle entraîne même une cytolysse partielle du tissu ectodermique. L'absence de différenciation nerveuse dans les explantats pourrait donc être due, non pas à la suppression du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale, mais à une action inhibitrice des cellules cytolysées. Cette action empêcherait l'ectoderme de répondre à un stimulus inducteur reçu dans les premières heures de contact avec le tissu mésodermique. Pour lever cette équivoque, un quatrième type d'expérience a été entrepris.

3.4 QUATRIÈME EXPÉRIENCE : INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LE POUVOIR INDUCTEUR DE LA LÈVRE BLASTOPORALE. CONTACT DE DURÉE LIMITÉE ENTRE L'ECTODERME ET LE TISSU INDUCTEUR.

La lèvre dorsale du blastopore traitée à l'actinomycine est mise en contact avec l'ectoderme compétent pendant 45 à 48 heures. Le sandwich est alors ouvert et les cellules mésodermiques sont soigneusement éliminées à l'aide d'une anse de platine. L'explantat est ensuite refermé et cultivé pendant 1 ou 2 jours. On évite de la sorte de laisser subsister des cellules en cytolysse ou en précytolysse à l'intérieur du sandwich. On sait qu'un contact de durée limitée (quelques heures) entre l'ectoderme compétent et l'organisateur suffit pour permettre à l'induction de se produire (JOHNEN, 1956 ; DENIS, 1957). Le tableau 5 résume les résultats de ce dernier type d'expérience.

TABLEAU 5

Influence de l'actinomycine (10 µg/ml) sur le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale
Contact de durée limitée entre l'ectoderme et le tissu inducteur

Nombre d'expériences	Durée de traitement de la lèvre blastoporale	Durée totale de culture (jours)	Différenciation de l'ectoderme	
			Tissu nerveux présent	Tissu nerveux absent
9	0	4	9	0
18	1	3-4	15	3
5	2	3	0	5
15	3	3	0	15
15	6	2	0	15 (*)

(*) Cytolysse après 48 heures.

Quand la lèvre dorsale n'a pas été traitée à l'actinomycine (témoin), mais a séjourné pendant 3 heures dans le milieu de culture normal, on observe dans tous les cas une neuralisation de l'ectoderme (fig. 23). Dans 3 cas sur 9, cependant, ce résultat n'a pas de signification, car le tissu inducteur n'a pas été complètement éliminé du sandwich : il se retrouve sous forme d'un nodule chordeal au contact de formations nerveuses.

Parmi les 18 cas où la lèvre dorsale a été traitée pendant 1 heure à l'actinomycine, 10 cas seulement peuvent être retenus, aucune trace du tissu inducteur n'ayant été retrouvée dans le sandwich. Dans 4 cas sur 10, la différenciation de l'ectoderme n'a pas été affectée par le traitement de la lèvre blastoporale. Dans 3 autres cas, l'ectoderme n'est que faiblement neuralisé et dans les trois derniers, le sandwich est tout entier formé d'un tissu sans organisation.

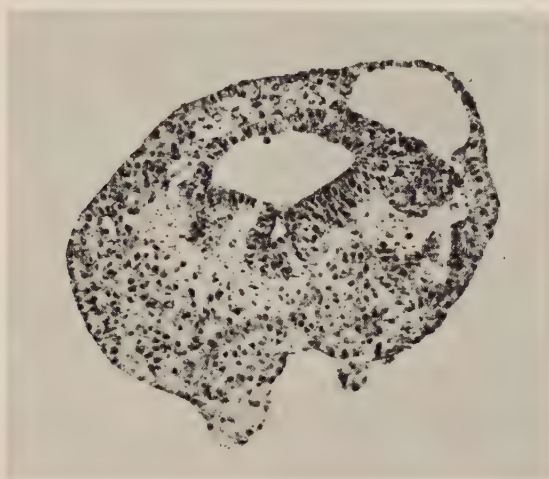


FIGURE 23.

Ectoderme présomptif de jeune gastrula cultivé pendant 45 heures au contact d'une lèvre blastoporale ayant séjourné 3 heures dans le milieu de culture normal. Le tissu inducteur a ensuite été retiré du sandwich et l'enveloppe de celui-ci a été cultivée 2 jours de plus en milieu normal. Une vésicule nerveuse est visible au centre de l'explantat.

Quand la lèvre dorsale du blastopore a subi un traitement de 2 heures à l'actinomycine, la différenciation nerveuse de l'ectoderme est totalement abolie. Le même résultat est obtenu lorsque la lèvre blastoporale est traitée pendant 3 heures (fig. 24), mais alors les parois du sandwich entrent fréquemment en cytolysse avant la fin de la culture. Si le traitement du tissu inducteur est prolongé jusqu'à 6 heures, la cytolysse de l'explantat se généralise déjà après 2 jours. L'ectoderme placé au contact d'une lèvre blastoporale traitée à l'actinomycine pendant 2 à 3 heures diffère de l'ectoderme atypique banal par son aspect compact et sa richesse en noyaux (fig. 24). Ces derniers ont une basophilie normale et

leurs nucléoles sont bien visibles. Ceci rend peu probable l'hypothèse d'une diffusion de l'antibiotique de la lèvre dorsale à l'ectoderme au cours du contact inducteur.



FIGURE 24.

Même expérience que sur la figure 23, mais la lèvre blastoporale a été traitée pendant 3 heures à l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$). Durée totale de culture : 3 jours. L'explantat est tout entier formé d'un tissu compact dépourvu d'organisation.

Conclusion.

Un séjour de 2 heures dans l'actinomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) suffit donc pour supprimer le pouvoir inducteur de la lèvre dorsale du blastopore. Un traitement plus court ne supprime que partiellement ce pouvoir inducteur. Un traitement plus long provoque une cytolyse plus ou moins rapide du tissu induit.

4. DISCUSSION.

Les expériences qui viennent d'être décrites mettent en évidence une triple action de l'actinomycine :

- 1) Suppression de la compétence de l'ectoderme. Cet effet est déjà produit par un traitement de quelques minutes à la température ordinaire ;
- 2) Suppression du pouvoir inducteur de la lèvre dorsale du blastopore. Un traitement de 1 à 2 heures est nécessaire pour produire cet effet ;
- 3) Disparition des structures nerveuses déjà différenciées.

D'autres aspects de la différenciation embryonnaire ont été

étudiées au moyen de l'actinomycine (KLEIN et PIERRO, 1963 : action sur les embryons de poulet explantés ; WALLACE et ELS-DALE, 1963 : action sur les embryons d'Amphibiens entiers et sur leurs cellules cultivées ; YAFFE et FELDMAN, 1964 : influence sur la formation des myoblastes en culture). Dans tous les cas, il a été constaté que l'antibiotique empêche ou trouble la différenciation des cellules, tout au moins tant que ces dernières ne sont pas engagées trop loin dans le processus de différenciation. Passé un certain point, celui-ci ne peut plus être arrêté par l'actinomycine.

Les effets morphostatiques de l'actinomycine pourraient résulter de la faculté que nous lui avons reconnue d'inhiber fortement la synthèse du RNA. L'action de l'actinomycine sur la polymérase de RNA est due à une fixation de l'antibiotique sur le DNA, rendant ainsi ce dernier inutilisable pour une transcription des messages génétiques. Une liaison entre l'actinomycine et le DNA a été observée *in vitro* à de nombreuses reprises (KIRK, 1960 ; KERSTEN, KERSTEN et RAUEN, 1960 ; GOLDBERG et RABINOWITZ, 1962 ; GOLDBERG, RABINOWITZ et REICH, 1962 ; REICH, GOLDBERG et RABINOWITZ, 1962 b ; SHATKIN, 1962 ; KAHAN, KAHAN et HURWITZ, 1963 ; CAVALIERI et NEMCHIN, 1964). *In vivo*, l'actinomycine se fixe également sur le DNA (KAWAMATA et IMANISHI, 1960 ; HARBERS et MUELLER, 1962 ; HARBERS, MUELLER et BACKMANN, 1963 ; DINGMAN et SPORN, 1965). Ce dernier constitue le site de liaison presque exclusif de l'actinomycine, bien que, après traitement des cellules vivantes, les mitochondries et le surnageant d'ultracentrifugation retiennent aussi une faible quantité d'antibiotique (DINGMAN et SPORN, 1965). Outre son action sur la synthèse du RNA, l'actinomycine inhibe également, mais dans une mesure beaucoup moindre, la synthèse du DNA (HURWITZ et al., 1962 ; REICH et al., 1962 a). Elle peut provoquer un arrêt des mitoses en prophase (GOLDSTEIN et al., 1960) et causer des fractionnements de chromosomes (OSTERTAG et KERSTEN, 1965). L'actinomycine produirait également une dépolymérisation du RNA à marquage rapide (ACS et al., 1963), ainsi qu'une dégradation des polyribosomes (REVEL, HIATT et REVEL, 1964 ; SHATKIN, SEBRING et SALZMAN, 1965). D'autres effets, incompatibles à première vue avec une action exclusive de l'actinomycine sur le DNA, ont été signalés. Entre autres, il faut noter l'inhibition exercée par l'antibiotique sur la synthèse de RNA dirigée par un virus à RNA (GOMATOS, KRUG et TAMM, 1964). Par contre, plusieurs autres mécanismes cellulaires, tels que la respiration et la glycolyse, ne paraissent pas affectés par l'acti-

nomycine (KIRK, 1960 ; REICH et al., 1962 b ; DAVIDSON et al., 1963). La synthèse des nucléotides ne semble pas non plus influencée par l'antibiotique (SPECTOR et KINOSHITA, 1965). Si donc l'actinomycine se conduit comme un inhibiteur puissant de la synthèse du RNA, d'autres effets, en particulier sur le RNA lui-même, ne sont pas exclus.

Si l'on attribue le blocage de la différenciation embryonnaire par l'actinomycine à l'inhibition qu'elle exerce sur la synthèse du RNA, rien ne dit que ce blocage soit uniquement dû à un arrêt de la production de mRNA. En effet, la synthèse des autres types de RNA (sRNA et rRNA) et en particulier, celle du rRNA est également sensible à l'actinomycine (PERRY, 1963 ; GEORGIEV, SAMARINA, LERMAN, SMIRNOV et SEVERTZOV, 1963 ; FRANKLIN, 1963). Il serait toutefois peu logique d'attribuer l'absence de différenciation dans les cellules traitées à l'actinomycine à une action de celle-ci sur la synthèse du RNA ribosomique et du RNA soluble. En effet, certains embryons de xénope, bien que privés, par suite d'une mutation, de toute possibilité de synthétiser du RNA ribosomique, peuvent se développer jusqu'à un stade avancé (BROWN et GURDON, 1964). Par ailleurs, le RNA soluble est, de tous les types de RNA, celui dont la synthèse est la moins affectée par l'actinomycine (TAMAOKI et MUELLER, 1962 ; MERITS, 1963).

Les effets principaux attribués à l'actinomycine, à savoir l'inhibition de la synthèse du RNA, de protéine et, dans une mesure beaucoup moindre, du DNA, ont été observés dans les cellules embryonnaires (voir chapitres 1 et 2). L'inhibition de la synthèse du RNA se manifeste morphologiquement par la disparition des nucléoles et par un pâlissement prononcé du suc nucléaire. Ceci n'empêche pas les mitoses de continuer à un rythme ralenti. Quand le traitement par l'actinomycine est de longue durée, les divisions s'arrêtent et les cellules entrent en cytolysse. Il importe de noter que les traitements qui ont produit les effets morphostatiques les plus spectaculaires étaient de courte durée, susceptibles d'affecter plus profondément le métabolisme du RNA que celui du DNA. Quant à la toxicité des traitements prolongés à l'actinomycine, elle pourrait n'être qu'une conséquence de l'action antimitotique exercée par celle-ci : l'observation cytologique des cellules en précytolysse suggère que la pycnose est précédée d'un blocage de mitoses en préprophase. Les doses d'actinomycine qui permettent aux cellules de survivre tout en ne se différenciant pas sont donc probablement celles qui inhibent la polymérase du RNA, tout en

laissant fonctionner la polymérase du DNA. On sait, en effet, depuis REICH (1964) qu'une concentration d'antibiotique 40 fois plus forte est requise pour inactiver la polymérase du DNA que pour inhiber celle du RNA. Notons enfin qu'aucune dégradation importante du RNA de forme stable (sRNA et rRNA) n'a été observée en présence d'actinomycine : celle-ci n'affecte pas de manière sensible la basophilie du cytoplasme.

Chacun des effets morphostatiques que nous avons reconnus à l'actinomycine exige, pour se manifester, des traitements de durée très différente. La compétence de l'ectoderme est abolie par une exposition de quelques minutes à l'actinomycine. Par contre, les structures nerveuses déjà formées ne disparaissent qu'après 72 à 96 heures de séjour dans l'antibiotique. Dans ce dernier cas, un facteur de perméabilité intervient, qui permet aux explantats de résister pendant plusieurs jours à une concentration relativement élevée d'actinomycine. Rappelons que les sandwiches étaient placés dans l'antibiotique après cicatrisation parfaite, si bien que la face interne des cellules, non protégée par la pellicule superficielle (HOLTFRETER, 1943), n'entre jamais en contact avec l'antibiotique. Dans les explantats de ce type, le pâlissement du suc nucléaire et la disparition des nucléoles ne deviennent complets qu'après 3 à 4 jours de culture. Par contre, lorsque la face interne de l'ectoderme est exposée à l'antibiotique (deuxième expérience), celui-ci manifeste déjà après 24 heures ses effets sur la colorabilité des noyaux. Il y a donc lieu de croire que l'antibiotique ne pénètre que très lentement à l'intérieur des sandwiches, une fois que ceux-ci sont cicatrisés. Ceci explique l'influence tardive de l'antibiotique sur l'évolution des explantats.

Que la suppression du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale exige un traitement plus prolongé que l'abolition de la compétence ne signifie pas nécessairement que ces deux phénomènes sont liés à un métabolisme nucléaire plus ou moins rapide. La suppression de la compétence de l'ectoderme ne se marque que 2 jours après le traitement à l'actinomycine. En d'autres mots, l'action de l'antibiotique s'exerce à retardement sur la différenciation cellulaire et un traitement léger suffit pour l'inhiber. Par contre, l'abolition du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale implique la suppression immédiate, dès avant la fin du traitement, de la production de substance inductrice. Or l'antibiotique n'agit qu'assez lentement sur les mécanismes cellulaires qu'il est censé inhiber (synthèse du RNA et des protéines : cf. les deux chapitres précédents). Il n'est donc pas étonnant qu'un traitement de plu-

sieurs heures soit nécessaire pour abolir le pouvoir inducteur des cellules blastoporales. La substance inductrice dont la production est arrêtée par l'actinomycine pourrait être aussi bien une protéine, agent inducteur postulé par YAMADA (1961) et VAHS (1962) qu'un acide ribonucléique, agent inducteur proposé par BRACHET (1942 b). Il n'est donc pas possible à la lumière de ces expériences de préciser la nature de la substance responsable de l'induction.

5. CONCLUSION.

L'actinomycine inhibe les processus conduisant à la formation du système nerveux. Cette action se manifeste aussi bien sur le pouvoir réacteur de l'ectoderme que sur le pouvoir inducteur du mésoderme. Les effets morphostatiques de l'actinomycine apportent des arguments en faveur de l'idée que le système de transcription de l'information génétique joue un rôle directeur dans les phénomènes de différenciation. Rien ne dit, toutefois, que l'antibiotique agit sur les cellules embryonnaires uniquement au niveau de la copie du RNA sur le DNA. Ce dernier processus est sûrement affecté par l'actinomycine, mais d'autres mécanismes cellulaires pourraient être touchés également.

DEUXIÈME PARTIE

**LIBÉRATION
DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE
AU COURS
DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

INTRODUCTION

L'inhibition produite par l'actinomycine sur le développement embryonnaire suggère que le DNA exerce un contrôle absolu sur le processus de la différenciation. Celle-ci ne s'amorce pas quand le DNA est rendu inaccessible pour toute transcription sous la forme de messenger. Le recours aux antibiotiques ne peut cependant apporter sur le mécanisme de la différenciation qu'une information limitée. La valeur de celle-ci dépend avant tout de la spécificité d'action de l'inhibiteur. Comme, dans le cas présent, il est impossible de prouver que l'actinomycine n'agit sur aucun autre mécanisme cellulaire que la synthèse du RNA, il est nécessaire de confirmer par d'autres méthodes les résultats obtenus jusqu'à présent. Une étude de la transcription du DNA sous la forme de messenger paraît spécialement indiquée : elle est susceptible de nous renseigner sur le moment où, durant la différenciation, les cellules recourent à l'information contenue dans leur DNA, ainsi que sur la quantité d'information transcrite durant ce processus.

Il est logique de penser que si le DNA contrôle les phénomènes de différenciation, le type de messenger transcrit varie d'une ébauche à l'autre, causant dans chacune d'elles l'apparition de protéines spécifiques. Comme les tissus n'apparaissent pas de façon synchrone durant le développement embryonnaire, on peut s'attendre à ce que les embryons en croissance contiennent des messagers spécifiques pour chaque stade. L'étude qui constitue la seconde partie du présent mémoire a été entreprise pour mettre cette hypothèse à l'épreuve.

Choix de la méthode.

La méthode de l'hybridation entre les acides nucléiques (HALL et SPIEGELMAN, 1961) permet de déterminer le degré d'homologie entre une séquence nucléotidique prise comme référence et d'autres séquences nucléotidiques appartenant, soit à la même espèce, soit à des espèces différentes. Dans ce procédé, le DNA est d'abord réduit à l'état unifilaire (dénaturé) par chauffage et refroidissement brusque, puis incubé à environ 20 °C en dessous

de son point de fusion avec l'acide nucléique (RNA ou DNA dénaturé) qui doit lui être comparé. Les régions complémentaires des deux acides nucléiques s'apparient de manière à former une structure hélicoïdale identique à celle qui existe dans le DNA natif (WATSON et CRICK, 1953). La molécule « hybride » (*) ainsi formée est stable, mais elle peut être décomposée en ses constituants par les procédés aptes à briser les ponts d'hydrogène (température élevée et faible concentration saline). Dans la plupart des techniques d'hybridation (BAUTZ et HALL, 1962 ; BOLTON et MAC CARTHY, 1962 ; NYGAARD et HALL, 1963 ; GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965), le DNA dénaturé est immobilisé par des moyens physiques. De la sorte, l'hybride qui se forme avec le DNA emprisonné peut être manipulé avec aisance. La méthode de l'hybridation se prête particulièrement bien à l'étude du RNA messenger (**), grâce au fait que celui-ci est complémentaire d'une grande longueur du DNA. Les autres types de RNA (RNAs soluble et ribosomique) sont eux aussi complémentaires du DNA, mais d'une région suffisamment courte (0,1 à 0,3 % de la longueur du génome) pour ne pas s'hybrider de façon notable dans les conditions où le mRNA s'associe avec le DNA.

Dans les expériences qui vont être décrites, on tirera donc parti de la faculté que possède le mRNA de s'hybrider facilement avec le DNA. Comme le mRNA ne se lie, en principe, qu'aux régions du DNA sur lesquelles il a été copié — et dont, partant, il est complémentaire — il sera possible de comparer les sites génomiques transcrits sous forme de mRNA dans les embryons en voie de développement. Pour ce faire, on recourra surtout à des expériences de compétition (HOYER, MAC CARTHY et BOLTON, 1964). Celles-ci sont basées sur la propriété que possède le RNA homologue non marqué de réduire par dilution isotopique la liaison entre le RNA radioactif et le DNA. Quand on incube une préparation de RNA marqué avec une autre préparation non marquée, seules les séquences nucléotidiques identiques dans les deux préparations entrent en compétition pour les sites communs dans le DNA. Pour les autres sites, aucune compétition n'a lieu.

(*) Pour plus de facilité, le terme « hybridation » sera employé pour qualifier la formation de structures hélicoïdales aussi bien entre le DNA et le RNA qu'entre le DNA et le DNA.

(**) Le terme « messenger » est employé ici sans aucune implication fonctionnelle d'aucune sorte. Le RNA messenger sera caractérisé par sa seule faculté de s'hybrider facilement avec le DNA (voir chapitre II). Les termes « RNA messenger », « mRNA » et « RNA hybridable » sont équivalents.

Plan du travail.

Dans un *premier chapitre*, nous examinerons la validité de la technique de compétition décrite ci-dessus, en tant que moyen de comparer les messagers synthétisés par les embryons de différents stades. Comme le RNA embryonnaire sera hybridé avec du DNA d'origine adulte, une comparaison sera faite entre le DNA embryonnaire et le DNA adulte, en vue de vérifier si ces DNAs sont formés de séquences de bases identiques.

Dans un *second chapitre*, les propriétés physiques et chimiques du mRNA synthétisé par les embryons en voie de développement seront étudiées. Si des régions différentes du génome sont exprimées aux divers stades de développement, ceci pourrait se traduire par des variations dans les caractéristiques du mRNA.

Dans un *dernier chapitre*, on comparera les types de messenger transcrits aux différents stades.

CHAPITRE I

VALIDITÉ DE LA MÉTHODE EMPLOYÉE : HYBRIDATIONS ENTRE LES ACIDES NUCLÉIQUES DE LA MÊME ESPÈCE OU D'ESPÈCES DIFFÉRENTES

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* a été employé dans les expériences qui forment la seconde partie du présent mémoire. Cette espèce se prête particulièrement bien aux études biochimiques, car elle fournit des pontes abondantes pendant toute l'année.

Accouplement des animaux et élevage des embryons.

Un jour avant l'accouplement, le mâle et la femelle sont placés dans une chambre à température constante (18 °C) avec réglage automatique de la lumière et de l'obscurité (12 heures de nuit, 12 heures de jour). Le mâle reçoit 2 jours de suite 250 unités de gonadotropine (Antuitrin « S » de Parke-Davis), dissoute dans 0,25 ml d'eau distillée. L'hormone est injectée dans l'espace lymphatique dorsal. Le second jour, vers 6 heures du soir, la femelle reçoit 500 à 1.000 unités de la même hormone et le couple est placé pour la nuit dans quelques litres d'eau de distribution. L'ovulation commence 10 à 14 heures après l'injection hormonale et se poursuit pendant 4 à 6 heures.

Le plus vite possible après la ponte, les œufs sont lavés à l'eau et débarrassés de leurs enveloppes par le procédé de TOWNES (1953) légèrement modifié. Les masses d'œufs sont secouées pendant 2 minutes à 23 °C dans une solution contenant 0,2 % de papaïne (Nutritional Biochemical Corp.) et 2 % de cystéine-HCl (activateur de la papaïne), ajustée à pH 8. Les œufs sont alors rincés très soigneusement et élevés à 18 °C dans de l'eau de dis-

tribution fréquemment renouvelée. Les stades de développement sont numérotés d'après la table de NIEUWKOOP et FABER (1956).

Gradients de saccharose.

La taille des molécules de RNA et de DNA a été étudiée en déterminant leur vitesse de sédimentation en gradient de saccharose. Ces gradients sont réalisés suivant le procédé de BROWN et LITTNA (1964 a). Les tubes de centrifugation (25 ml) sont remplis d'une solution de saccharose dont la concentration varie de 5 % en surface à 20 % au fond. Cette solution est ajustée à pH 5 au moyen d'un tampon acétate 0,01 M ; elle contient en outre de l'EDTA 10^{-4} M. Un ml de la solution à étudier (RNA ou DNA marqué) est déposé au-dessus du gradient et centrifugé à 24.000 tpm pendant 18 heures à 5-6 °C dans la Spinco modèle L. Après la centrifugation, des fractions de 1 ml sont prélevées par le fond du tube et leur radioactivité est mesurée. Pour cela, 0,1 mg de RNA de levure (entraîneur) et 0,1 ml de TCA 55 % sont ajoutés à chaque fraction. Les acides nucléiques ainsi précipités sont passés sur des filtres Millipore (HA). Les filtres sont séchés à l'air chaud et comptés soit dans un compteur à flux de gaz, s'il s'agit de P^{32} , soit dans un appareil à scintillation liquide, s'il s'agit de C^{14} .

Extraction et marquage de DNA.

Le DNA est extrait soit de noyaux de foie, soit d'érythrocytes par une modification du procédé de MARMUR (1961). Les noyaux ou les érythrocytes sont lysés dans la solution suivante ajustée à pH 8 : NaCl, 0,15 M ; EDTA, 0,1 M ; SDS, 1 à 2 %. A la solution très visqueuse ainsi obtenue, on ajoute du perchlorate de Na 5 M, de manière à réaliser une concentration finale de 1 M. La préparation est ensuite secouée violemment pendant 10 minutes avec un volume égal du mélange suivant : chloroforme, 24 volumes ; alcool isoamylique, 1 volume. La suspension est centrifugée à 2.000 tpm pendant 5 minutes, la phase supérieure est reprise et secouée de nouveau avec du chloroforme. Après une nouvelle centrifugation, la phase aqueuse est prélevée et transférée dans un récipient étroit. On lui ajoute 2 volumes d'alcool éthylique froid (-20 °C). Le DNA précipite en longues fibres que l'on peut facilement enrouler sur une baguette de verre. Les fibres de DNA sont séchées et redissoutes dans du milieu SSC dilué 10 fois (en

abrégié : $0,1 \times \text{SSC}$), à la concentration approximative de 1 mg/ml. Quand la dissolution est complète, ce qui peut prendre de 10 à 15 heures, le DNA est purifié plus avant par agitation avec un volume égal de phénol saturé d'eau. La suspension est centrifugée à 10.000 tpm pendant 10 minutes, la phase supérieure est reprise et agitée de nouveau avec du phénol. On renouvelle l'opération jusqu'à ce qu'aucun précipité de protéine dénaturée n'apparaisse plus à l'interface eau-phénol. Le DNA est alors précipité à l'alcool, enroulé sur une baguette de verre et finalement dissous dans du $0,1 \times \text{SSC}$. La concentration du DNA est déterminée par mesure de la densité optique à 260 m μ .

Dans quelques cas, le DNA a été préparé par la méthode à la pronase de BERNIS et THOMAS (1965). A en juger par sa transparence, le DNA obtenu par ce procédé est d'une pureté comparable à celle du DNA extrait par la méthode de MARMUR. Le DNA d'espèces autres que le xénope a été préparé à partir de foie comme il vient d'être décrit. Le DNA de thymus de veau et le DNA de sperme de saumon étaient des préparations commerciales.

Du DNA radioactif a été préparé à partir de têtards différenciés marqués au C^{14} depuis le début du développement. Les embryons reçoivent 4 impulsions de 1 heure dans le C^{14}O_2 , à des intervalles de 24 heures (c'est-à-dire aux stades 11, 26-28, 33 et 39). Le DNA marqué de cette manière a une activité spécifique de 200 à 700 cpm/ μg et sa contamination protéique ne dépasse pas quelques pour-cent. Du DNA d'activité spécifique beaucoup plus élevée (50.000 cpm/ μg) a été obtenu à partir de cellules de rein cultivées in vitro et marquées à la thymidine tritiée (don du Dr I. B. DAWID).

Fragmentation et dénaturation du DNA.

Ainsi que l'ont montré MAC CARTHY et BOLTON (1963), le DNA unifilaire ne s'hybride pas avec le DNA dans l'agar, à moins qu'il ne soit réduit en fragments de faible poids moléculaire. Le DNA a été fragmenté par exposition aux ultra-sons au moyen d'une micro-sonde Branson ajustée à la puissance 6. La solution à fragmenter est d'abord débarrassée de l'oxygène dissous par barbotage d'azote, afin de réduire la possibilité d'oxyder les bases, puis exposée aux ultra-sons pendant 6 minutes à 0 °C. Le DNA traité de cette manière a un coefficient de sédimentation d'environ 10 S en gradient de saccharose.

Le DNA dissous dans du $0,1 \times \text{SSC}$ est dénaturé par chauffage

à 95-100 °C pendant 5 minutes et refroidissement brusque dans un bain de glace.

Marquage et extraction du RNA.

Le RNA embryonnaire est marqué par injection dans la femelle d'une mC de P^{32} sous forme de phosphate inorganique (KUTSKY, 1950). L'injection se fait dans la cavité péritonéale 10 à 12 heures avant le début de l'ovulation. De cette manière, une grande quantité de P^{32} passe dans le pool inorganique de l'œuf et reste présent sous cette forme durant tout le développement embryonnaire (BROWN et LITTNA, 1964 a). Tous les acides nucléiques synthétisés depuis la fécondation jusqu'au moment de la prise de nourriture sont marqués par ce procédé.

Pour des marquages courts, la méthode de BROWN et CASTON (1962) a été employée. Les embryons (100/ml) sont placés dans une fiole hermétiquement fermée, remplie à moitié de solution de HOLTFRETER (1931), tamponnée à pH 6 au moyen de phosphate de Na 0,1 M. Cette solution contient de la pénicilline et de la streptomycine à la concentration de 0,1 mg/ml ; elle est bouillie juste avant l'emploi, afin d'éliminer le $C^{12}O_2$ qui s'y trouve. Quatre à cinq μC de $NaHC^{14}O_3$ par ml de solution sont injectés dans la fiole à travers le bouchon de caoutchouc qui la ferme et le système est agité lentement à 21-23 °C pendant 1 heure.

Le RNA a été extrait des embryons par la méthode au SDS-phénol froid de BROWN et LITTNA (1964 a). Les embryons (20 par ml de solution) sont homogénéisés à 0 °C dans du tampon acétate 0,1 M, pH 5, contenant 5 $\mu g/ml$ de PVS, en tant qu'inhibiteur de la RNase (FELLIG et WILEY, 1959). Du SDS est ensuite ajouté jusqu'à la concentration finale de 0,5 %. L'homogénat est agité à 0 °C pendant 10 minutes avec un volume égal de phénol saturé d'eau. La suspension est centrifugée à 10.000 tpm pendant 10 minutes et le surnageant est agité de nouveau en présence de phénol froid. Après une nouvelle centrifugation, le RNA est précipité de la phase aqueuse par addition de NaCl (concentration finale : 0,1 M) et de 2 volumes d'alcool éthylique froid (-20 °C). Le mélange est gardé à -20 °C pendant plusieurs heures, pour assurer une floculation parfaite du RNA. Ce dernier est récupéré par centrifugation et redissous à la concentration approximative de 1 mg/ml dans du tampon acétate 0,01 M, pH 5, contenant 1 $\mu g/ml$ de PVS. Le RNA est précipité de nouveau au moyen d'alcool éthylique, récupéré et redissous une seconde fois. Le même processus est ensuite répété une troisième fois. Le RNA extrait de

cette manière n'est pas dégradé, à en juger par le poids moléculaire élevé de certaines de ses fractions (BROWN et LITTNA, 1964 a). Après une impulsion d'une heure dans le $C^{14}O_2$, les préparations de RNA contiennent à peu près 5 % de protéine (en cpm) et de 0 à 5 % de DNA, suivant le stade. Le RNA marqué de façon continue au P^{32} contient à peu près la même proportion de contaminants.

Détermination de la composition en bases du RNA.

La composition en bases du RNA- P^{32} est déterminée après hydrolyse du RNA par le KOH 0,3 M à 37 °C pendant 18 heures. Après refroidissement à 0 °C, l'hydrolysat est neutralisé et amené à pH 1. Les nucléotides sont ensuite absorbés sur charbon activé (25 mg de charbon par ml d'hydrolysat) pendant 1/2 heure à 0 °C. Le charbon est récupéré par filtration sur Millipore et les nucléotides sont élués du charbon par agitation à 37 °C pendant 2 heures dans la solution suivante : NH_4OH , 1 % ; alcool éthylique, 50 %. On élimine le charbon par centrifugation et concentre le surnageant contenant les nucléotides. On sépare ceux-ci par chromatographie sur papier dans le système alcool éthylique-eau-sulfate d'ammonium de LANE (1963). Les taches correspondant à chaque nucléotide sont découpées, séchées et comptées dans des fioles à scintillation contenant 15 ml de fluor.

Tests d'hybridation.

Le DNA préparé à partir de tissus adultes a été immobilisé dans l'agar suivant la méthode de BOLTON et MAC CARTHY (1962). Le DNA, dissous dans du $0,1 \times SSC$ à la concentration de 1 ou 2 mg/ml, est chauffé à 100 °C pendant 5 minutes, puis mélangé avec un volume égal d'agar (agar-agar Oxoid, n° 3) 8 % porté à la température de 110 °C. Les deux solutions sont mélangées très soigneusement pendant 5 minutes à 100 °C, puis refroidies brusquement dans un bain de glace. Le bloc d'agar contenant le DNA immobilisé est fragmenté en grains d'environ 1 mm de diamètre par passage à travers une toile métallique. Les grains d'agar sont ensuite calibrés au moyen d'un crible, de manière à éliminer les fragments dont le diamètre est inférieur à 1 mm. Les grains sont enfin lavés à 60 °C dans du $2 \times SSC$ (100 ml par g d'agar) et filtrés sur Buchner. Ce lavage élimine les impuretés présentes dans la préparation de DNA (nucléotides, protéines, RNA), ainsi que le DNA non emprisonné. La teneur en DNA de l'agar est déterminée

comme suit. Une quantité donnée de DNA-agar est pesée et dissoute à 100 °C dans du perchlorate de Na 5 M. La densité optique de cette solution est mesurée à 260 m μ en prenant comme « blanc » une solution contenant une quantité identique d'agar « vide » (dépourvu de DNA). La concentration finale du DNA dans l'agar varie de 0,4 à 1,3 mg par g de poids humide.

Les tests d'hybridation sont faits de la manière suivante. La quantité voulue de RNA ou de DNA marqué est incubée à 60 °C dans du 2 $\times$ SSC avec un poids déterminé de DNA-agar. Ainsi que l'ont montré HOYER, MAC CARTHY et BOLTON (1963), la quantité de radioactivité restant liée au DNA-agar après hybridation à 60 °C dépend à la fois de la durée d'incubation (fig. 25) et du volume total de solution par rapport au poids d'agar employé (fig. 26). En fonction de ces essais préliminaires, les conditions suivantes ont été adoptées pour les expériences d'hybridation.

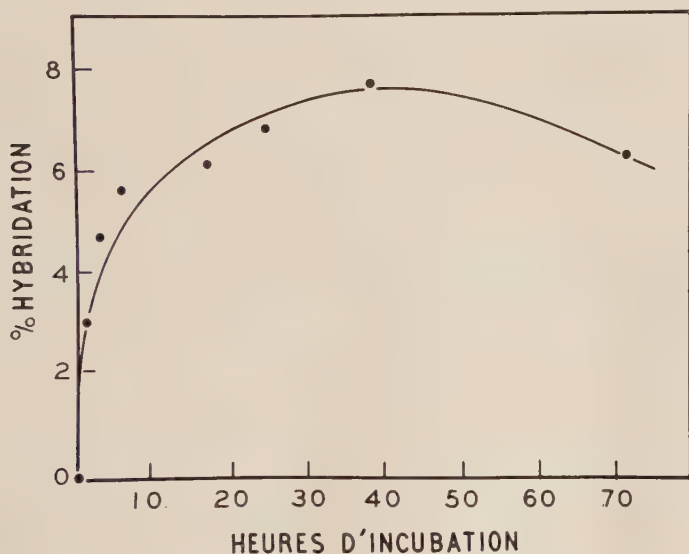


FIGURE 25.

Influence de la durée d'incubation sur le pourcentage d'hybridation entre le RNA et le DNA de xénope emprisonné dans l'agar. Cent quatre-vingt-dix mg d'agar contenant 84 μ g de DNA ont été incubés à 60 °C pendant les durées indiquées avec 100 μ g de RNA embryonnaire marqué (2.400 cpm). Les chiffres figurant en ordonnée représentent le pourcentage du nombre de coups restant liés au DNA immobilisé à la fin de chaque période d'incubation. Liaison non spécifique : 5 cpm.

La diminution du pourcentage de liaison durant le troisième jour d'incubation est due à la fuite du DNA emprisonné dans l'agar par suite d'un lent processus de dégradation thermique.

Pour des raisons de facilité, la durée d'incubation a été limitée à 15-18 heures. Le milieu d'incubation comprend 1 ml de $2 \times \text{SSC}$ par g d'agar.

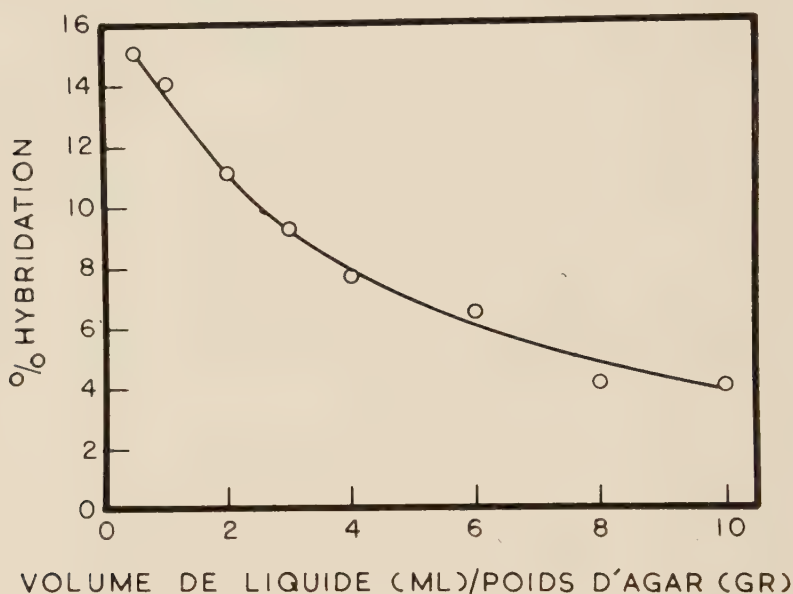


FIGURE 26.

Influence du volume du milieu d'incubation sur le pourcentage d'hybridation entre le DNA fragmenté de xénope et le DNA de la même espèce immobilisé dans l'agar. Dix μg de DNA marqué au C^{14} ont été incubés avec 100 μg de DNA-agar dans un volume croissant de $2 \times \text{SSC}$.

A la fin de la période d'incubation, les grains d'agar sont transférés dans un « sac à thé » (MAC CARTHY et HOYER, 1964). Ce dernier consiste en un tube de verre siliconé de 5 mm de diamètre, fermé à une extrémité par un morceau de toile de « saran » (fibre synthétique), dont les mailles sont espacées de 0,5 mm. Cette toile retient les grains d'agar et permet de passer commodément ceux-ci d'une solution de lavage à l'autre. L'agar est rincé 10 fois dans 10 ml de $2 \times \text{SSC}$ à 60°C (10 minutes chaque fois), de façon à enlever tout le matériel non lié au DNA. Au cours de ce lavage, 5 à 15 % du DNA présent dans l'agar s'échappent de celui-ci. Le RNA ou le DNA hybridé avec le DNA-agar est libéré de celui-ci par un passage dans 5 bains (10 ml chacun) de $0,01 \times \text{SSC}$ à 75°C .

Dans quelques expériences, les hybrides DNA-RNA ont été traités à la RNase (exempte de DNase) avant l'élution à 75°C .

Après les rinçages à 60 °C, l'agar est trempé pendant 15 minutes à 23 °C dans 10 ml de $2 \times \text{SSC}$ contenant 1 µg/ml de RNase. L'agar est alors rincé 4 fois dans 10 ml de $2 \times \text{SSC}$ pour éliminer la RNase. Le RNA hybridé est enfin élué à 75 °C dans du tampon acétate 0,01 M, pH 5, contenant 1 µg/ml de PVS, comme inhibiteur de la RNase.

La radioactivité présente dans les bains de rinçage et dans les fractions hybridées est mesurée en passant le contenu de chaque tube à travers des filtres Millipore. Chaque tube a reçu au préalable 200 µg de RNA de levure (entraîneur) et 1 ml de TCA 55 %. Les filtres sont ensuite séchés et comptés comme indiqué plus haut.

Liaison non spécifique.

L'importance de la liaison non spécifique, due à la persistance après tous les lavages d'une certaine quantité de DNA ou de RNA non hybridé mais lié à l'agar, a été vérifiée en incubant du DNA ou du RNA radioactif avec de l'agar « vide ». Quand on emploie du DNA d'activité élevée, le pourcentage de liaison non spécifique peut être assez important, à moins que l'on ajoute du RNA de levure (100-200 µg) au milieu d'incubation. Si l'on prend cette précaution, le pourcentage de liaison non spécifique ne dépasse jamais 2,5 % de la radioactivité de départ par g d'agar et l'importance de cette liaison est, en gros, proportionnelle au poids d'agar utilisé. Dans la plupart des expériences, la quantité de DNA-agar employée a été limitée à 100 mg. Le pourcentage de liaison non spécifique déterminé dans des incubations parallèles avec de l'agar « vide » a chaque fois été soustrait des résultats expérimentaux.

2. RÉSULTATS.

2.1 SPÉCIFICITÉ D'ESPÈCE DES HYBRIDATIONS DNA-DNA ET DNA-RNA.

Si l'hybridation entre le DNA dans l'agar et le RNA ou le DNA fragmenté résulte d'un mécanisme précis d'appariement de bases, aucune réaction ne devrait être observée entre les acides nucléiques appartenant à des espèces non apparentées. Par contre, on peut s'attendre à un certain degré d'hybridation entre les acides nucléiques d'organismes voisins du point de vue taxonomique (HOYER et al., 1964). En vue de vérifier cette supposition, du DNA marqué de xénope a été mis en compétition avec des quantités croissantes de DNA non radioactif provenant d'autres espèces. Si le DNA hétérologue possède des séquences nucléotiques com-

munes avec le DNA de xénope, il entrera en compétition pour les mêmes sites du DNA de xénope emprisonné. Par conséquent, la quantité de DNA marqué qui s'attache au DNA immobilisé sera réduite. Quand on emploie du DNA non marqué de xénope comme compétiteur, on obtient une courbe de dilution, qui est à peu près linéaire en coordonnées logarithmiques (fig. 27). Le DNA non marqué de deux espèces différentes de grenouille (*Rana pipiens* et *Rana sylvatica*) est moins compétitif que le DNA de xénope. Le DNA d'une salamandre (*Amblystoma tigrinum*) et d'un triton (*Triturus viridescens*) est moins compétitif encore. Quant au DNA de *Escherichia coli*, il n'entre pas du tout en compétition avec le

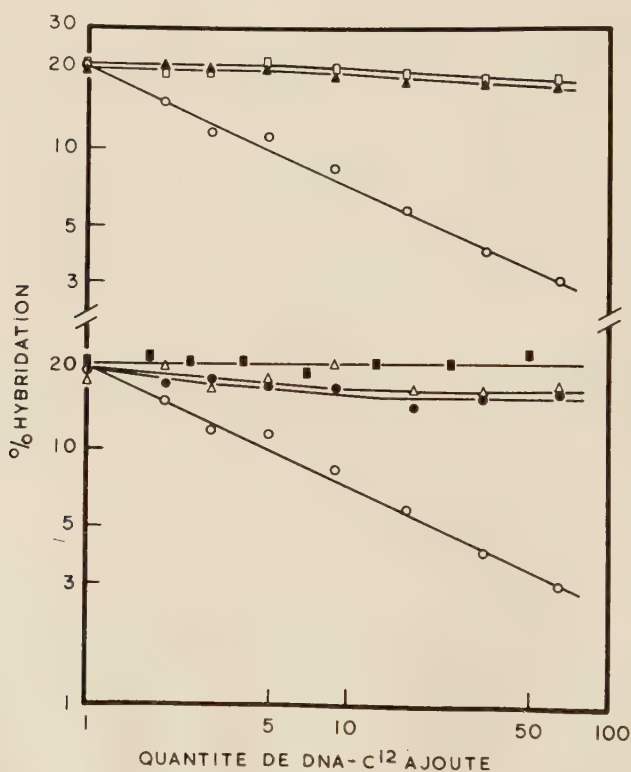


FIGURE 27.

Spécificité d'espèce de l'hybridation du DNA. Cinq μg de DNA- C^{14} (3.500 cpm) de xénope ont été incubés avec 100 μg de DNA immobilisé de xénope et des quantités croissantes de DNA non marqué de la même espèce (O—O), ou d'espèces étrangères : *Rana pipiens* (●—●), *Rana sylvatica* (Δ—Δ), *Triturus viridescens* (□—□), *Amblystoma tigrinum* (▲—▲) et *Escherichia coli* (■—■).

DNA de xénope. Dans une seconde série d'expériences, du DNA d'espèces appartenant à d'autres classes de Vertébrés que les Amphibiens (Mammifères, Oiseaux et Poissons) a été comparé au DNA de xénope. Le DNA de poule, de saumon et de bœuf interfère très peu avec l'hybridation normalement observée entre le DNA de xénope et le DNA de la même espèce emprisonné dans l'agar (fig. 28). Parmi les hybridations interspécifiques qui viennent d'être décrites, beaucoup ont été faites dans la direction opposée (croisements inverses). Dans ces expériences, du DNA d'espèces étrangères est emprisonné dans l'agar et hybridé avec du DNA de xénope marqué et fragmenté.

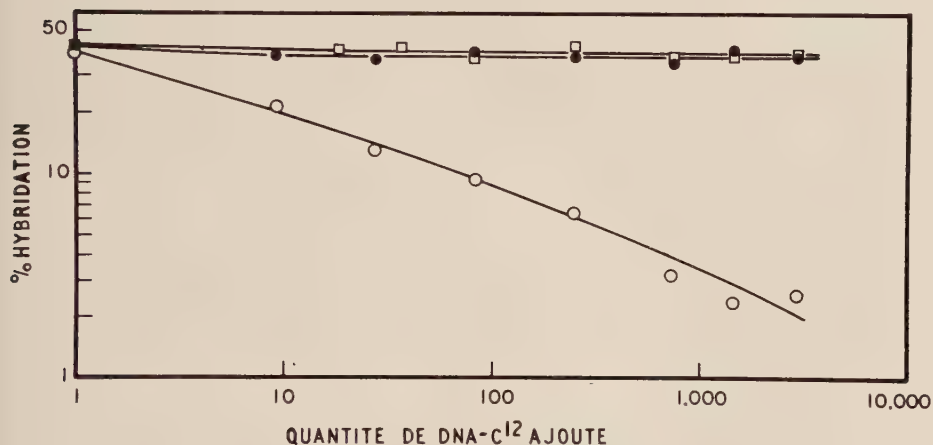


FIGURE 28.

Spécificité d'espèce de l'hybridation du DNA. Une petite quantité (0,05 μg) de DNA- H^3 (2.500 cpm) de xénope a été incubé avec 50 μg de DNA immobilisé de xénope et des quantités croissantes de DNA non marqué de la même espèce (O—O) ou d'espèces étrangères (saumon, ●—● et bœuf, □—□). Un troisième croisement a été fait entre le DNA de xénope et celui de poule, mais les résultats ne sont pas montrés sur la figure.

Tous les résultats des hybridations interspécifiques sont rassemblés dans le tableau 6. Les chiffres figurant dans la deuxième colonne (croisements directs) correspondent au pourcentage d'inhibition que le DNA hétérologue peut introduire dans le système homologue (xénope-xénope). Ces chiffres sont censés refléter le pourcentage de séquences nucléotidiques communes entre le DNA des deux espèces comparées (HOYER et al., 1964). Les résultats présentés dans la troisième colonne (croisements inverses)

TABLEAU 6

Pourcentage de réaction croisée entre le DNA de *Xenopus laevis* et le DNA de :

Espèce	Croisements directs (% d'inhibition de la réaction homologue : xénope-xénope)	Croisements inverses (***) (% de la réaction homologue : xénope-xénope)
<i>Xenopus laevis</i>	100 (*)	100
<i>Rana pipiens</i>	28 (*)	25
<i>Rana sylvatica</i>	22 (*)	—
<i>Amblystoma tigrinum</i>	19 (*)	4
<i>Triturus viridescens</i>	14 (*)	—
saumon	11 (**)	11
bœuf	6 (**)	4
poule	2	5
<i>Escherichia coli</i>	0 (*)	0

(*) Résultats repris de la figure 27.

(**) Résultats repris en partie de la figure 28.

(***) 5 µg de DNA-C¹⁴ de xénope (3.500 cpm) on été hybridés avec 100 µg de DNA immobilisé des espèces énumérées dans la première colonne. Dans ces conditions, 28 % du DNA marqué de xénope s'hybride avec le DNA immobilisé de la même espèce.

ont été obtenus par hybridation de DNA de xénope avec du DNA d'autres espèces emprisonné dans l'agar.

Les résultats des deux types de comparaison sont en bon accord. Seuls les croisements entre un Anoure et un Urodèle ont donné des résultats discordants. Les données du tableau 6 suggèrent que les séquences nucléotidiques communes (ou tout au moins suffisamment semblables pour pouvoir s'hybrider à 60 °C) entre le DNA d'Urodèle et le DNA d'Anoure représentent une proportion plus faible du génome d'Urodèle que du génome d'Anoure (*).

Quand du RNA provenant d'embryons de xénope est hybridé

(*) Cette particularité pourrait être en rapport avec la très grande richesse en DNA des cellules d'Urodèle.

TABLEAU 7

Hybridation entre le RNA () de xénope et le RNA
d'autres espèces*

Espèces	% hybridation	% de la réaction homologue (xénope-xénope)	% de la réaction croisée dans le système DNA-DNA (**)
<i>Xenopus laevis</i>	9,0	100	100
<i>Rana pipiens</i>	2,3	26	28
saumon	1,5	17	11
bœuf	1,6	18	6
poule	0,3	3	2
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0

(*) 27 µg de RNA-C¹⁴ (4.200 cpm) provenant d'embryons de stade bourgeon caudal incubés avec 100 µg de DNA dans l'agar.

(**) Résultats repris du tableau 6.

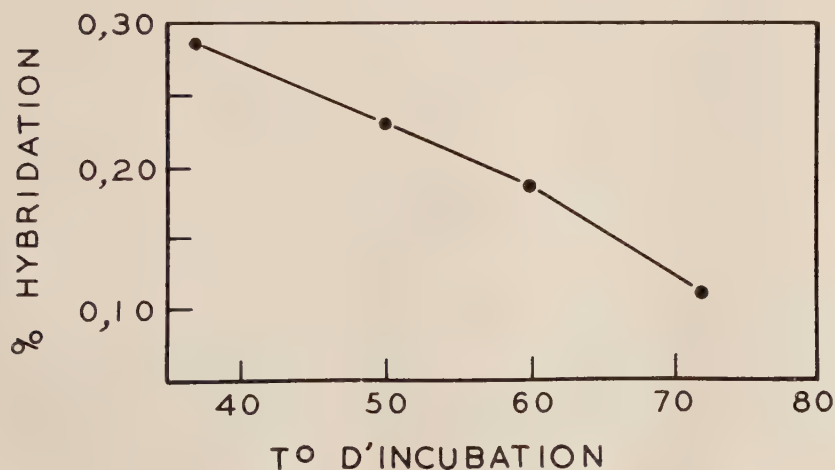


FIGURE 29.

Pourcentage d'hybridation entre le RNA de xénope et le DNA de saumon emprisonné dans l'agar en fonction de la température d'incubation. Cent trente-cinq µg de RNA-P³² (15.000 cpm) extrait d'embryons de stade 42 (têtards prêts à se nourrir) ont été incubés à diverses températures avec 145 µg de DNA de saumon emprisonné dans l'agar. Dans ces conditions, environ 0,45 % de la radioactivité présente dans le RNA s'hybride à 60 °C avec le DNA de xénope.

avec du DNA d'espèces de plus en plus éloignées, le pourcentage d'hybridation diminue, comme dans le système DNA-DNA (tableau 7). Ceci n'est vrai que si l'hybridation est faite à 60 °C. Quand la température d'incubation est abaissée, la réaction devient de moins en moins spécifique. La spécificité d'espèce est presque entièrement abolie à 37 °C (fig. 29).

2.2 STABILITÉ THERMIQUE DU DNA ET DU RNA HYBRIDÉS.

Si l'hybridation entre le DNA dans l'agar et le RNA ou le DNA fragmenté implique l'établissement de ponts d'hydrogène entre bases complémentaires, le point de fusion des acides nucléiques

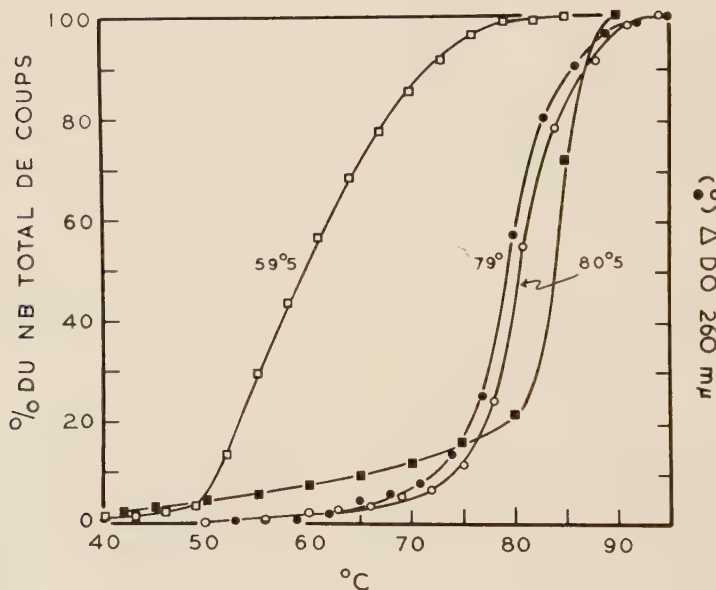


FIGURE 30.

Profil de fusion du DNA de xénope hybridé avec du DNA immobilisé dans l'agar (□—□). Dix-sept µg de DNA fragmenté (12.000 cpm) ont été incubés à 60 °C avec 190 µg de DNA-agar. Le matériel non lié a été éliminé en lavant l'agar avec 100 ml de $2 \times \text{SSC}$ à 60 °C. L'agar a alors été transféré dans une enceinte thermostatée, la concentration saline a été abaissée à $0,4 \times \text{SSC}$ et la température augmentée progressivement de 40 °C à 85 °C. Après 15 minutes d'équilibration à chaque température, deux fractions de 10 ml ont été passées sur l'agar. La radioactivité libérée à chaque température a ensuite été déterminée. Nombre total de coups élués : 1.600. La courbe de fusion optique du DNA natif non fragmenté (○—○) et celle du DNA fragmenté par exposition aux ultra-sons (●—●) sont montrées dans un but comparatif. Pour déterminer la perte du DNA emprisonné au cours du processus d'éluion (■—■), du DNA radioactif a été immobilisé dans l'agar et soumis au programme d'éluion décrit ci-dessus. T_m du DNA hybridé : 59,5 °C. T_m du DNA natif fragmenté : 79 °C.

hybridés devrait être proche de celui du DNA natif. Pour vérifier cette supposition, la stabilité thermique des hybrides DNA-DNA et DNA-RNA a été examinée.

Dans une première expérience, du DNA marqué a été incubé à 60 °C avec du DNA dans l'agar, puis rincé à 60 °C dans du $2 \times \text{SSC}$, de manière à enlever le DNA radioactif en excès. Le DNA hybridé est alors progressivement élué comme indiqué sous la figure 30. La courbe de fusion du DNA hybridé a une forme sig-

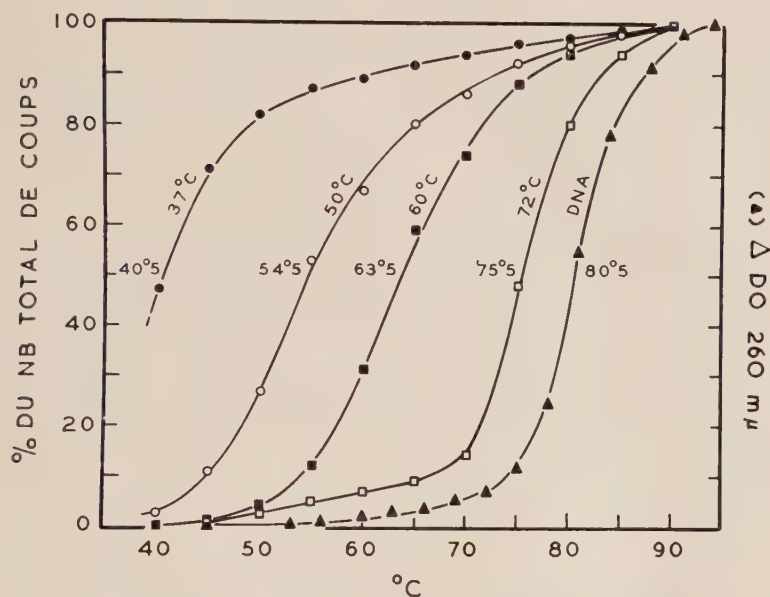


FIGURE 31.

Profil de fusion des hybrides DNA-RNA formés par incubation à diverses températures. Cent trente-cinq μg de RNA- P^{32} (15.500 cpm) provenant d'embryons de stade 28 (bourgeon caudal) ont été incubés avec 100 mg d'agar contenant 125 μg de DNA, puis lavés à la température d'incubation au moyen de 100 ml de $2 \times \text{SSC}$. Programme d'élué comme indiqué sous la figure 30. La courbe de fusion du DNA natif dans du $0,4 \times \text{SSC}$ est montrée dans un but comparatif ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$). Le T_m des hybrides formés à diverses températures est indiqué par les chiffres horizontaux placés à côté des courbes de fusion.

moïde ressemblant à celle du DNA natif. Une certaine quantité de DNA emprisonné s'échappe de l'agar même à la température d'élué la plus basse (42 °C). La quantité de DNA perdu demeure assez faible jusqu'à 80 °C. Au-delà de cette température, l'agar commence à se dissoudre et perd tout le DNA qu'il contenait. Si

On tient compte de la fuite du DNA emprisonné au cours du processus d'élution, on trouve que le DNA hybridé « fond » environ 17 °C plus bas que le DNA natif. Il apparaît donc que les liens formés entre le DNA fragmenté et le DNA-agar sont beaucoup moins stables thermiquement que ceux qui existent dans le DNA natif. Une constatation analogue a été faite par WALKER et MAC LAREN (1965) sur le DNA de souris.

La stabilité des hybrides RNA-DNA formés à différentes températures a été étudiée de la même manière (fig. 31). Plus la température d'incubation est élevée, plus le point de fusion des hybrides est élevé et plus les courbes de fusion deviennent raides. La température de fusion des hybrides formés à 72 °C n'est que 5 °C plus basse que celle du DNA natif. Si l'on tient compte de la fuite du DNA emprisonné au cours du processus d'élution, on constate que l'hybride formé à 72 °C a presque la même température de fusion que le DNA natif.

La stabilité thermique de plus en plus grande des hybrides formés à température de plus en plus élevée pourrait être due à l'inclusion dans les hybrides de séquences nucléotidiques contenant une proportion croissante de guanine et de cytosine. Les hybrides les moins stables thermiquement contiendraient moins de paires G-C (plus stables que les paires A-U) et seraient donc élués plus facilement. Cette explication n'est toutefois pas valable car la composition en bases des hybrides formés à différentes températures ne varie pas en fonction de celles-ci.

2.3 SENSIBILITÉ À LA RNASE DES HYBRIDES DNA-RNA.

La stabilité thermique des hybrides DNA-RNA formés à 72 °C montre que ces hybrides sont, tout au moins en grande partie, de structure hélicoïdale. La stabilité réduite des hybrides formés en dessous de 72 °C (fig. 31) indique que des régions d'appariement imparfait sont incluses dans les hybrides obtenus à basse température. La longueur des régions mal adaptées présentes dans les hybrides DNA-RNA a été étudiée en mesurant la sensibilité de ceux-ci à la RNase. On sait, en effet, depuis HALL et SPIEGELMAN (1961) que l'hybride DNA-RNA est résistant à la RNase. Dans les conditions employées (RNase 1 µg/ml ; pH neutre), le RNA hybridé à 50 °C et au-dessus est résistant à la RNase. Seuls les hybrides formés à 37 °C sont partiellement (20-50 %) convertis en produits acido-solubles par la RNase. Ces hybrides contiennent donc des

régions mal appariées (boucles, bouts libres, etc...), qui restent sensibles à l'attaque de la RNase.

2.4 SÉQUENCES DU DNA IMPLIQUÉES DANS LA FORMATION D'HYBRIDES À DIVERSES TEMPÉRATURES.

Les expériences décrites jusqu'à présent suggèrent que le degré de similitude requis pour la formation d'une molécule hybride entre le DNA et le RNA est de moins en moins absolu à mesure que la température d'incubation est abaissée (fig. 29 et 31). Certaines régions du RNA qui ne sont que partiellement complémentaires du DNA pourraient être impliquées dans la formation d'hybrides à 37 °C mais être exclues de ces hybrides à plus haute température. L'expérience décrite dans le tableau 8 confirme

TABLEAU 8

Quantité de RNA hybridé avec du DNA dans l'agar après incubation à différentes températures ()*

Cpm hybridés après la première incubation	Cpm hybridés après la deuxième incubation	
240	37 °C	1012
	50 °C	552
	60 °C	377
	72 °C	373

(*) Cinq aliquotes (60 µg ; 11.000 cpm) de RNA-C¹⁴ provenant d'embryons de stade 28 ont été incubés pendant 15 heures à 72 °C avec 100 mg d'agar contenant 125 µg de DNA. Une aliquote a été lavée à 72 °C et son niveau d'hybridation a été déterminé (première colonne). Trois autres aliquotes ont été enlevées et incubées un jour de plus à 37 °C, 50 °C et 60 °C, respectivement. Le dernier échantillon a été gardé de bout en bout à 72 °C. Tous les échantillons ont été lavés à la température de la seconde incubation et la quantité de RNA lié a été déterminée comme d'habitude (dernière colonne).

cette supposition. Du RNA embryonnaire marqué a été incubé pendant 15 heures à 72 °C avec du DNA emprisonné. La température d'incubation a alors été changée comme indiqué dans le tableau. Il apparaît clairement que la préincubation à 72 °C n'empêche pas une grande quantité de RNA de se lier au DNA durant la seconde étape à 50 °C ou 37 °C. Apparemment, des régions importantes du DNA et du RNA qui ne pouvaient se lier à 72 °C

parce qu'elles étaient trop différentes, peuvent le faire à basse température. La seconde étape à 60 °C a donné un niveau d'hybridation pratiquement identique à celui qu'a fourni la seconde incubation à 72 °C. Ceci suggère qu'aucune séquence nucléotidique nouvelle n'est impliquée dans les hybrides quand la température d'incubation est abaissée de 72 °C à 60 °C. Si cette interprétation est correcte, la stabilité différente des hybrides formés à 72 °C et à 60 °C (fig. 31) ne résulterait pas de l'hybridation, à ces deux températures, de molécules de RNA formées de séquences nucléotidiques différentes.

2.5 INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE SUR LA FORMATION DES HYBRIDES.

Si l'hybridation entre le DNA dans l'agar et le RNA ou le DNA fragmenté résulte de l'établissement de ponts d'hydrogène entre bases complémentaires, ce processus devrait être perturbé par les agents capables de se fixer sur le DNA, tels que l'actinomycine D.

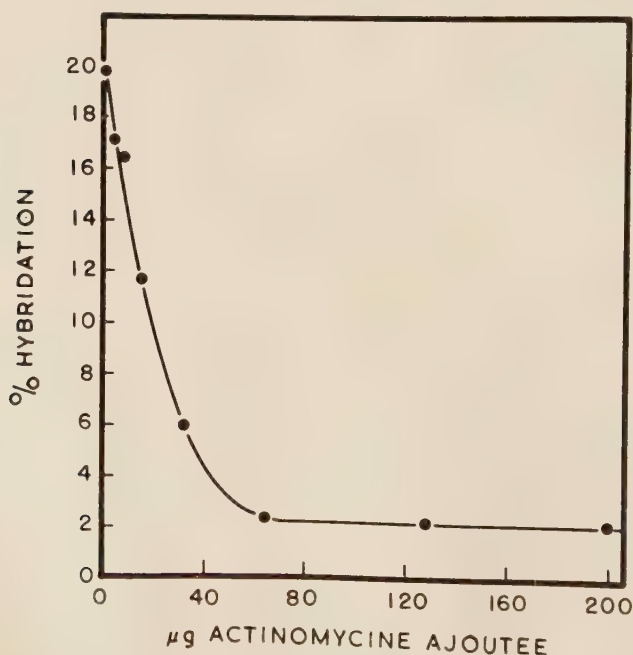


FIGURE 32.

Influence de l'actinomycine D sur l'hybridation entre le DNA fragmenté de xénope et le DNA de la même espèce emprisonné dans l'agar. Cinq µg de DNA-C¹⁴ (3.500 cpm) et 210 mg d'agar contenant 100 µg de DNA ont été incubés dans 210 µl de 2 × SSC avec une dose croissante d'actinomycine.

L'affinité de l'actinomycine pour le DNA a été montrée à plusieurs reprises (KIRK, 1960 ; KERSTEN et al., 1960 ; REICH et al., 1962 b). L'antibiotique inhibe l'hybridation du DNA fragmenté avec le DNA dans l'agar (fig. 32), ainsi que l'hybridation du RNA embryonnaire avec le DNA (fig. 33). L'actinomycine n'a aucun effet sur le RNA seul (fig. 33). Un certain degré d'hybridation entre le DNA immobilisé et le DNA marqué persiste même à la concentration d'actinomycine la plus élevée (fig. 32). Cette observation a été faite à plusieurs reprises. Sa signification n'est pas claire.

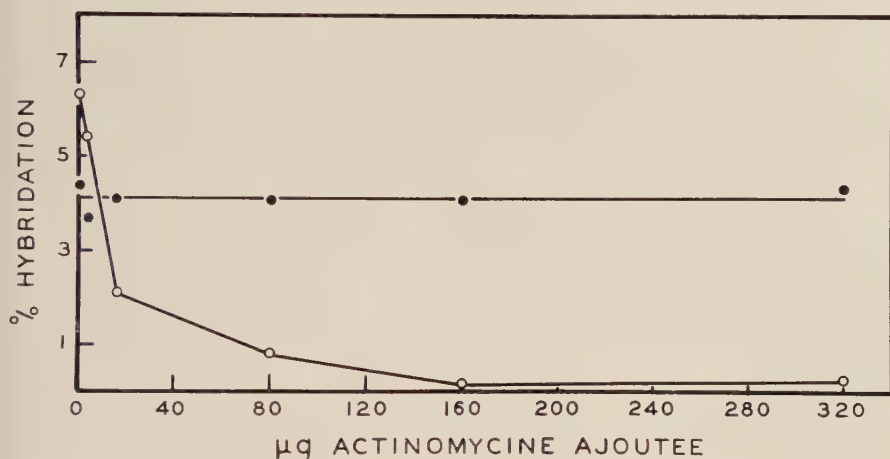


FIGURE 33.

Influence de l'actinomycine D sur l'hybridation entre le RNA et le DNA emprisonné dans l'agar. Cent µg de RNA marqué (1.750 cpm) provenant d'embryons de stade 28 (bourgeon caudal) ont été incubés dans 200 µl de $2 \times \text{SSC}$ avec 200 mg d'agar contenant 33 µg de DNA. Des quantités croissantes d'actinomycine ont été ajoutées au milieu d'incubation (O—O). Les quantités indiquées d'actinomycine ont aussi été incubées avec 150 µg de RNA seul ; l'antibiotique non lié au RNA a été enlevé par dialyse et le pourcentage d'hybridation du RNA a été déterminé (●—●).

Des expériences de contrôle ont montré que, dans les conditions employées, l'antibiotique ne produit aucune fuite du DNA emprisonné et se fixe sur le DNA unifilaire (tel qu'il est présent dans l'agar) aussi bien que sur le DNA bifilaire. En effet, le DNA dénaturé comme le DNA natif déplacent vers le rouge la bande de 440 mµ présente dans le spectre d'absorption de l'actinomycine. Ceci doit être interprété comme une preuve de liaison entre le DNA et l'antibiotique (KERSTEN et KERSTEN, 1962 ; REICH, 1964). Au surplus, l'actinomycine se fixe avec une égale affinité sur le

DNA natif et sur le DNA dénaturé au cours d'une dialyse d'équilibre. Après incubation de 30 μg de DNA unifilaire ou bifilaire avec 100 μg d'actinomycine dans 1 ml de $2 \times \text{SSC}$, et dialyse prolongée, une molécule d'antibiotique reste liée par groupe de 25 nucléotides aussi bien dans le DNA natif que dans le DNA dénaturé.

2.6 IDENTITÉ DES PRÉPARATIONS DE DNA EXTRAITES DE DIVERS TISSUS.

Du DNA fragmenté d'embryons entiers de xénope a été mis en compétition avec des quantités croissantes de DNA non radioactif isolé à partir de différents tissus de xénope (fig. 34). Dans tous les cas, du DNA provenant d'érythrocytes de la même espèce était emprisonné dans l'agar. Toutes les préparations examinées sont à peu près également compétitives vis-à-vis du DNA embryonnaire.

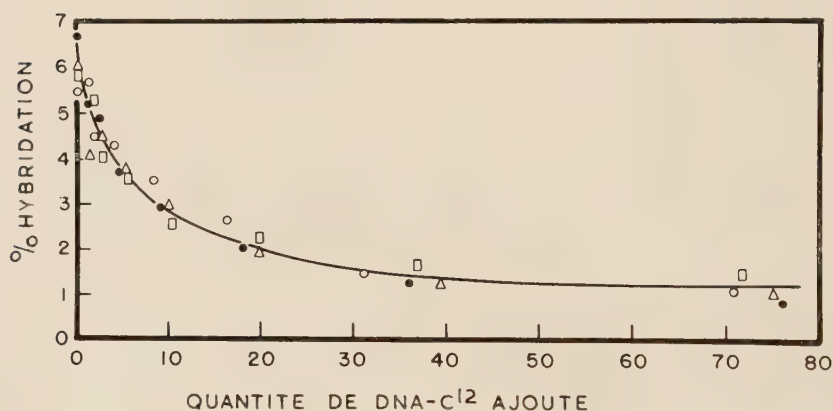


FIGURE 34.

Expérience de compétition entre du DNA embryonnaire et du DNA préparé à partir de divers tissus adultes. Cinq μg de DNA marqué (3.500 cpm) provenant d'embryons de stade 42 (têtards prêts à se nourrir) ont été incubés avec 100 mg d'agar contenant 50 μg de DNA extrait d'érythrocytes adultes. Des quantités croissantes de DNA non marqué de diverses origines ont été ajoutées au milieu d'incubation : embryons entiers (O—O), sang adulte (●—●), cœur adulte (Δ — Δ) et foie adulte ($\square$ — $\square$).

Si des différences existent entre les séquences nucléotidiques des diverses préparations comparées, ces différences sont trop faibles pour être perçues par la méthode utilisée. MAC CARTHY et HOYER (1964) sont arrivés à une conclusion identique à la suite d'une étude similaire sur le DNA de souris.

2.7 SATURATION DU DNA ADULTE PAR LE DNA EMBRYONNAIRE.

S'il y a identité complète entre les séquences nucléotidiques du DNA embryonnaire et du DNA adulte, ces DNAs devraient être capables de s'hybrider l'un avec l'autre sur toute leur longueur. Quand une petite quantité de DNA d'érythrocytes est incubée avec des quantités croissantes de DNA fragmenté provenant de têtards

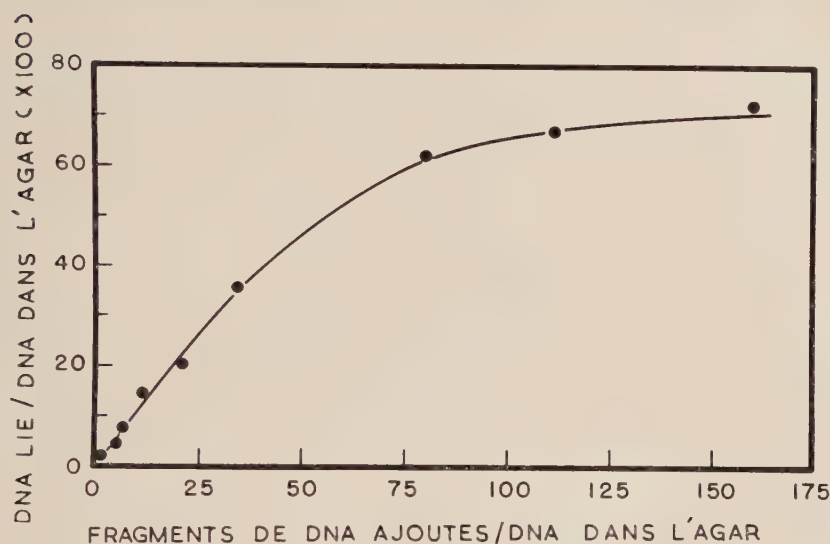


FIGURE 35.

Saturation du DNA d'érythrocytes emprisonné dans l'agar par du DNA embryonnaire. Dix mg d'agar contenant 5 μ g de DNA ont été incubés avec des quantités croissantes de DNA provenant d'embryons de stade 42 (têtards prêts à se nourrir). Volume total du milieu d'incubation : 100 μ l.

différenciés, 70 à 75 % du DNA adulte peut être saturé par le DNA embryonnaire (fig. 35). Si l'on admet qu'il n'existe pas de séquences mal appariées (boucles, bouts libres) dans les hybrides DNA-DNA, on peut conclure qu'au moins trois quarts des séquences nucléotidiques sont identiques dans le DNA embryonnaire et dans le DNA adulte.

2.8 POURCENTAGE DE DNA LIÉ EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE DNA OFFERTE POUR L'HYBRIDATION.

Si, à une petite quantité de DNA fragmenté, on offre de plus en plus de DNA emprisonné, le pourcentage d'hybridation augmente (fig. 36). Un très grand excès de DNA immobilisé (700 à 1) est nécessaire pour retenir 50 % de la radioactivité de départ. L'allure

de la courbe d'hybridation suggère que certains fragments de DNA (ceux qui sont retenus aux rapports DNA/DNA les plus faibles) trouvent un site de liaison plus facilement que d'autres. Un tel comportement pourrait résulter de l'existence de fragments de DNA de taille très inégale dans les échantillons employés pour l'hybridation. On peut soupçonner que les fragments les plus courts s'hybrident plus facilement que les fragments les plus longs. Une

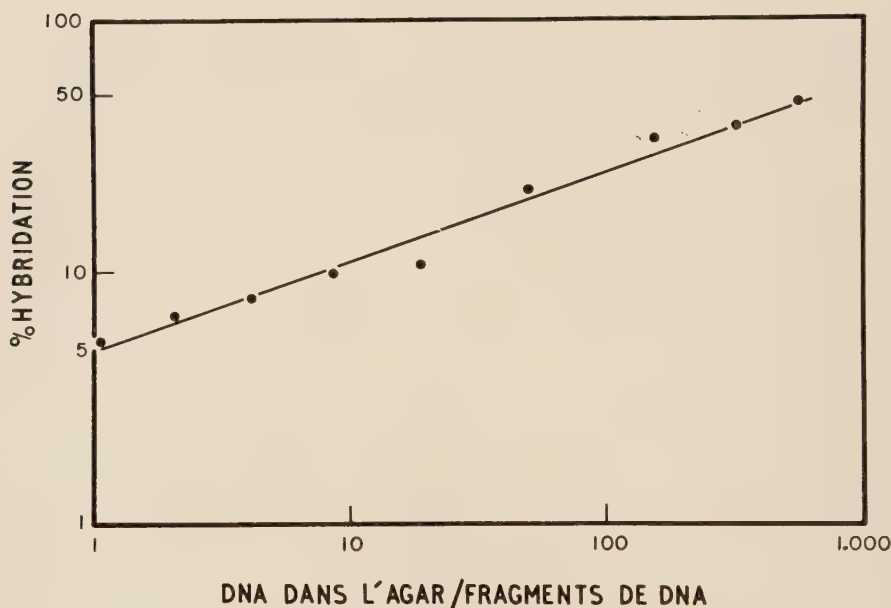


FIGURE 36.

Hybridation du DNA fragmenté avec une quantité croissante de DNA dans l'agar. Cinq μg de DNA- C^{14} (3.500 cpm) ont été incubés à 60 °C avec une quantité de plus en plus grande d'agar contenant du DNA d'érythrocytes. Volume du milieu d'incubation : 1 ml de $2 \times \text{SSC}$ par g d'agar.

telle explication n'est toutefois pas valable, car les fragments de DNA qui s'hybrident avec le DNA emprisonné possèdent le même coefficient de sédimentation (environ 4-10 S) en gradient de saccharose que les fragments qui ne s'hybrident pas. Qui plus est, les fragments retenus au cours d'une première incubation s'hybrident de nouveau quand on les met en présence d'une nouvelle quantité de DNA frais. De même, les fragments qui ne s'hybrident pas lors d'une première incubation ne s'hybrident pas davantage au cours d'un second essai. Une constatation analogue a été faite par WALKER et MAC LAREN (1965) sur le DNA de souris.

3. DISCUSSION.

L'inhibition par l'actinomycine de l'hybridation entre le DNA dans l'agar et le RNA ou le DNA peut s'expliquer aisément par l'affinité observée entre l'antibiotique et le DNA dénaturé. Cette dernière constatation est toutefois en désaccord avec les données de la littérature (HURWITZ et AUGUST, 1963 ; KAHAN et al., 1963), selon lesquelles l'actinomycine se lie au DNA natif, mais très peu ou pas du tout au DNA dénaturé. Si la liaison observée ici entre l'actinomycine et le DNA unifilaire résulte, comme l'ont suggéré KAHAN et al. (1963) et REICH (1964), de la persistance dans le DNA dénaturé de courtes régions bifilaires, l'influence de l'actinomycine sur le processus d'hybridation serait due à un effet de nature inconnue sur le DNA ou sur le RNA.

Aucune distinction n'a pu être établie entre le DNA embryonnaire et le DNA provenant de divers tissus adultes. Dans les limites de sensibilité de la technique employée, on peut dire qu'il n'existe pas de différence entre l'information génétique telle qu'elle est présente dans l'embryon en voie de développement et telle qu'on la trouve dans les tissus adultes. Le développement embryonnaire n'implique donc pas une quelconque mutation au niveau du DNA, mutation qui varierait d'un organe à l'autre et serait la cause de la différenciation. Le caractère uniforme et totipotent de l'information génétique présente dans les cellules adultes a déjà été montré par GURDON (1962).

L'influence de la température d'incubation sur la stabilité des hybrides DNA-DNA (fig. 31) suggère que les séquences nucléotidiques du RNA peuvent s'associer dans le DNA avec toute une variété de régions présentant avec elles-mêmes une ressemblance plus ou moins complète. Une telle redondance — ou plutôt, quasi-redondance — existerait dans le génome de souris (BRITTEN, communication personnelle). Elle pourrait expliquer la stabilité réduite des hybrides DNA-RNA (fig. 31) et DNA-DNA formés à 60 °C (WALKER et MAC LAREN, 1965). Une telle particularité, si elle existait aussi dans le génome de xénope, permettrait de comprendre pourquoi certains fragments de DNA s'hybrident plus facilement que d'autres avec le DNA emprisonné dans l'agar (fig. 36). Les fragments de DNA qui ne s'hybrident pas même en présence d'une très grande quantité de DNA emprisonné pourraient représenter les séquences nucléotidiques les plus rares dans le génome de xénope. Si cette supposition est correcte, l'impossibilité d'hybrider plus de 40 à 50 % du DNA fragmenté, même quand

on lui offre un grand excès de DNA dans l'agar (HOYER et al., 1964 ; DAWID, 1965) ne serait pas entièrement due à des difficultés techniques inhérentes à la méthode employée, telles qu'un accès difficile du DNA immobilisé. Normalement, la complexité du génome de Vertébré empêche toute renaturation du DNA unifilaire en solution libre (MARMUR et DOTY, 1961). Seules les séquences répétées de nombreuses fois dans le DNA seraient, après fragmentation, capables de s'hybrider avec le DNA immobilisé. Les séquences redondantes représenteraient moins de 50 % de la longueur totale du DNA chez la souris et le xénope. Une partie importante du DNA (75 %) peut cependant s'hybrider quand on lui offre des fragments de DNA en concentration suffisante pour permettre aux séquences nucléotidiques les plus rares de trouver un site de liaison (fig. 35 et HOYER et al., 1964).

Les expériences qui viennent d'être décrites montrent que la précision avec laquelle les séquences nucléotidiques sont appariées dans les hybrides DNA-DNA et DNA-RNA n'est pas absolue. A cet égard, les acides nucléiques de Bactérie se comportent de manière différente, puisque les hybrides formés à 60 °C entre le DNA immobilisé et le DNA ou le RNA ont une stabilité thermique très voisine de celle du DNA natif (BOLTON et MAC CARTHY, 1961). Chez le xénope, la résistance des hybrides DNA-RNA à la RNase indique que, durant une incubation à 60 °C, une association assez étroite se produit entre les acides nucléiques mis en présence. Au surplus, la spécificité d'espèce à laquelle obéissent les hybridations DNA-DNA montre qu'une homologie poussée doit exister entre les acides nucléiques intéressés pour que l'hybridation puisse avoir lieu. Tout ceci n'exclut pas que des séquences mal adaptées soient incluses dans les hybrides, spécialement dans ceux qui résultent d'une incubation à basse température (37 °C et 50 °C). Dans ces « hybrides », de nombreuses séquences nucléotidiques du RNA sont probablement associées avec des régions du DNA différentes de celles sur lesquelles elles ont été transcrites (tableau 8). Pareilles erreurs doivent être absentes dans les hybrides formés à 72 °C, puisque le point de fusion de ces derniers est très proche de celui du DNA natif. Les hybrides formés à 60 °C, malgré leur stabilité réduite (fig. 31), ne semblent pas intéresser des séquences du DNA très différentes de celles qui sont impliquées dans les hybrides obtenus à 72 °C (tableau 8). On peut donc conclure que des régions mal appariées existent dans les hybrides formés à 60 °C (conditions normales), mais ces erreurs semblent d'importance relativement faible, suffisamment faible pour ne pas mettre en doute la validité

de la méthode d'hybridation, en tant que moyen d'étudier l'activité des gènes au cours du développement embryonnaire.

4. CONCLUSION.

Les hybrides DNA-RNA formés à 60 °C possèdent plusieurs caractéristiques reconnues aux structures hélicoïdales : résistance à la RNase, courbe de fusion sigmoïde. Les hybrides ne se forment qu'entre les acides nucléiques de la même espèce ou d'espèces voisines ; ils ne se forment pas si le DNA est rendu inaccessible par l'actinomycine. Des régions d'appariement imparfait existent dans les hybrides formés à 60 °C, mais ces régions semblent d'importance minime. On peut donc s'attendre à ce que le RNA messager transcrit sur une région déterminée du DNA s'hybride avec cette région parce qu'elle lui est complémentaire, et pas avec le reste du DNA. Sur ce principe seront basées les comparaisons entre les messagers synthétisés par les embryons de différents stades. L'emploi de DNA d'origine adulte pour hybrider le RNA embryonnaire est justifié, puisqu'aucune différence n'a pu être décelée entre le DNA embryonnaire et le DNA de divers tissus adultes.

CHAPITRE II

PROPRIÉTÉS DU RNA MESSAGER SYNTHÉTISÉ PAR LES EMBRYONS EN VOIE DE DÉVELOPPEMENT

Si des régions différentes du génome sont transcrites dans les embryons en voie de développement, les propriétés physiques et chimiques du mRNA pourraient varier d'un stade à l'autre. Cette possibilité sera examinée dans le présent chapitre. Seront étudiées successivement : la vitesse de marquage, la composition en bases, la stabilité thermique et la vitesse de dégradation du mRNA synthétisé par les embryons en voie de développement.

1. MÉTHODES.

Le DNA a été extrait des tissus adultes et immobilisé dans l'agar comme décrit précédemment. Les méthodes employées pour le marquage, l'extraction et l'hybridation du RNA embryonnaire, ainsi que pour la détermination de sa composition en bases ont également fait l'objet d'une description détaillée dans le chapitre précédent.

2. RÉSULTATS.

2.1 HYBRIDATION DU RNA EMBRYONNAIRE AVEC DES QUANTITÉS CROISSANTES DE DNA EMPRISONNÉ DANS L'AGAR.

Quand du RNA extrait d'embryons exposés au $C^{14}O_2$ pendant une heure est hybridé avec des quantités croissantes de DNA emprisonné, le pourcentage de radioactivité liée augmente suivant une courbe en 2 phases [fig. 37 (b) et (c)]. Le RNA marqué au P^{32} depuis le début du développement se comporte de la même manière [fig. 40 (a)], ainsi que le RNA de foie de souris marqué par une

courte impulsion (HOYER et al., 1963). Par contre, le RNA d'œufs mûrs exposés au P^{32} durant l'oogenèse s'hybride suivant une courbe sans cassure [fig. 37 (a)]. L'allure des courbes d'hybridation (fig. 37 et 40) indique que le RNA embryonnaire constitue une population mélangée de molécules. Il y a des molécules qui s'hybrident à un rapport DNA/RNA peu élevé, c'est-à-dire quand très peu de DNA est disponible. Il y a aussi des molécules qui ne s'hybrident pas, à moins qu'on ne leur fournisse un très grand excès de DNA.

Comme l'ont déjà montré HOYER et al. (1963) pour le RNA de foie de souris, la distinction entre le RNA hybridable et le RNA non hybridable apparaît encore quand on soumet le RNA embryonnaire à un second cycle d'incubation (fig. 38). Le RNA qui s'hybride lors d'une première incubation s'hybride de nouveau au cours d'un second essai [fig. 38 (c)]. Seule une petite quantité du RNA qui ne s'est pas hybridé pendant la première incubation reste liée quand on la met en présence de DNA frais [fig. 38 (b)].

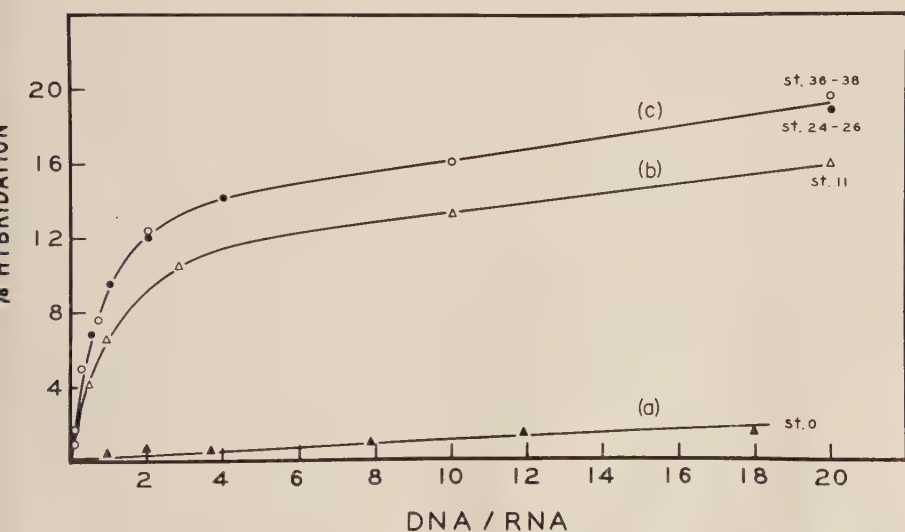


FIGURE 37.

Hybridation du RNA marqué provenant de gastrulas (st. 11, Δ — Δ), d'embryons de stade bourgeon caudal (st. 24-26, $\bullet$ — $\bullet$) et de têtards actifs (st. 36-38, $\circ$ — $\circ$) avec des quantités croissantes de DNA dans l'agar. Dans chaque cas, les embryons ont été exposés au $C^{14}O_2$ pendant une heure. Les chiffres figurant en ordonnée représentent le pourcentage de la radioactivité de départ qui reste liée au DNA à la fin de l'incubation. Le niveau d'hybridation du RNA d'œufs vierges [(a), $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$] marqués au P^{32} plusieurs mois avant l'ovulation a aussi été déterminé.

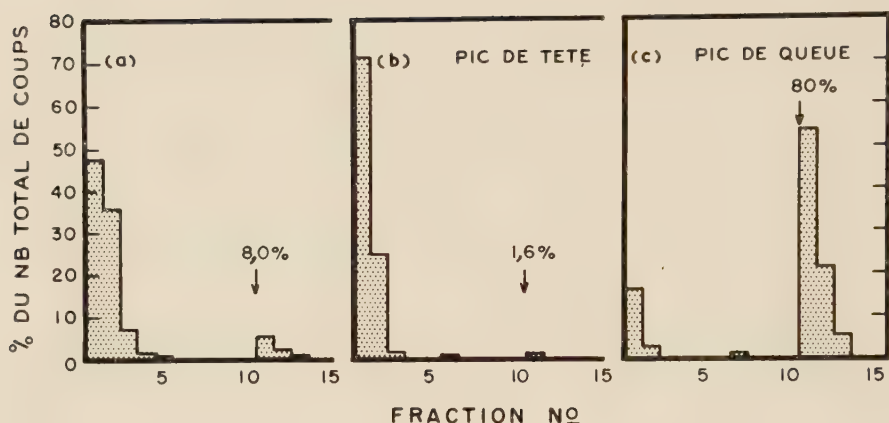


FIGURE 38.

Réincubation du RNA- C^{14} lié et non lié au DNA-agar après une première incubation. Douze cents μg de RNA provenant de têtards différenciés exposés au $C^{14}O_2$ pendant 1 heure ont été incubés avec 1 g d'agar contenant 420 μg de DNA. La figure (a) montre le profil d'élution de ce RNA au moyen de $2 \times \text{SSC}$ à 60°C (fractions 1-10) et de $0,01 \times \text{SSC}$ à 75°C (fractions 10-15). La moitié de chacun des pics a été réincubée avec 0,5 g d'agar contenant 210 μg de DNA. Le pic de tête (non hybridé) a donné le profil d'élution (b). Le pic de queue (hybridé) a donné le profil d'élution (c).

2.2 COMPOSITION EN BASES ET STABILITÉ THERMIQUE DU RNA HYBRIDABLE SYNTHÉTISÉ PAR LES EMBRYONS EN VOIE DE DÉVELOPPEMENT.

La composition en bases de la fraction hybridable et de la fraction non hybridable du RNA- P^{32} est décrite dans le tableau 9. Le contenu en G + C du RNA non hybridable est proche de celui du sRNA et du rRNA (60 % de G + C) et il augmente légèrement durant l'ontogenèse. Chez les embryons exposés au P^{32} depuis le moment de la fécondation, une proportion croissante du RNA marqué est formée par du sRNA et du rRNA, qui s'accumulent durant le développement. C'est pourquoi la composition en bases du RNA total se rapproche de celle du sRNA et du rRNA (BROWN et LITTEA, 1964 a). Il en va de même pour le RNA non hybridable, puisque celui-ci contient 90 à 99 % de la radioactivité présente dans le RNA total (fig. 40).

Le RNA hybridable provenant de gastrulas et de neurulas a la même composition en bases que le DNA (42 % de G + C, DAWID, 1965). Le RNA hybridable extrait d'embryons plus âgés possède une teneur en G + C plus élevée. Puisque le contenu de G + C du RNA hybridable augmente au cours du développement,

TABLEAU 9

Composition en bases du RNA-P³² ()
provenant d'embryons de différents stades*

Stade	RNA non hybridé		RNA hybridé	
	Moles %	% G + C	Moles %	% G + C
12-14 (gastrula)	C 23	57	C 18	42
	G 34		G 24	
	A 25		A 26	
	U 18		U 32	
16-19 (neurula)	C 29	55	C 19	40
	G 26		G 21	
	A 25		A 33	
	U 20		U 27	
26-28 (bourgeon caudal)	C 27	58	C 24	47
	G 31		G 23	
	A 24		A 27	
	U 18		U 26	
38-40 (têtard actif)	C 31	59	C 26	49
	G 28		G 23	
	A 23		A 27	
	U 18		U 24	
42 (prise de nourriture)	C 31	61		
	G 30			
	A 22			
	U 17			
DNA (suivant DAWID, 1965)			C 21	42
			G 21	
			A 29	
			T 29	

(*) 110 µg de RNA incubés avec 250 mg d'agar contenant 220 µg de DNA.

la température de fusion du mRNA devrait croître elle aussi. Cette supposition n'est toutefois pas correcte, car le RNA hybridable de gastrulas, celui de stade bourgeon caudal et celui de têtards différenciés ont, à 1 ou 2 °C près, une température de fusion identique (fig. 39). Les résultats du tableau 9 et de la figure 39 sont donc en

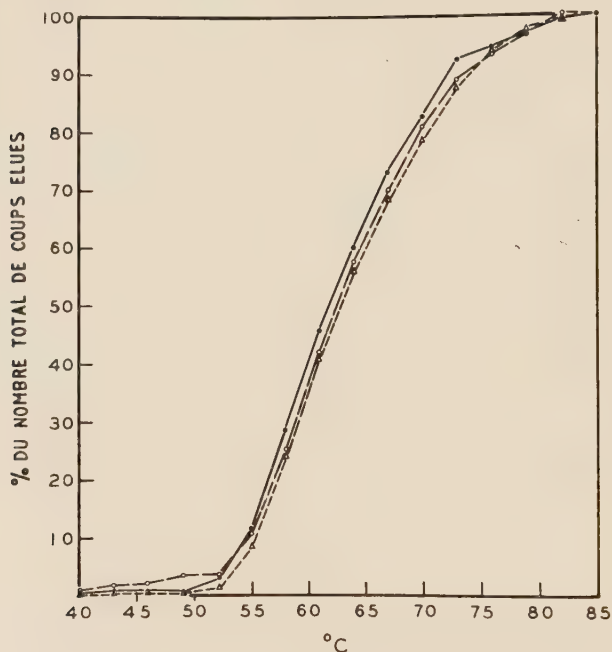


FIGURE 39.

Courbes de fusion du RNA extrait de gastrulas (st. 12, ○---○), d'embryons de stade bourgeon caudal (st. 28, ●—●) et de têtards différenciés (st. 42, △----△) hybridé avec du DNA emprisonné dans l'agar.

Les courbes de fusion ont été obtenues en « fondant » simultanément le RNA d'embryons de 2 stades différents, marqués les uns au C¹⁴, les autres au P³². Quatre comparaisons ont été faites entre :

- 1) du RNA-P³² de stade 12 et du RNA-C¹⁴ du même stade (témoin) ;
- 2) du RNA-P³² de stade 12 et du RNA-C¹⁴ de stade 28 ;
- 3) du RNA-P³² de stade 12 et du RNA-C¹⁴ de stade 42 ;
- 4) du RNA-P³² de stade 28 et du RNA-C¹⁴ de stade 42.

Pour chaque comparaison, 100 embryons marqués au C¹⁴ et 100 embryons marqués au P³² ont été mélangés avant l'extraction. Huit cent quarante µg de RNA doublement marqué ont été incubés à 60 °C avec 190 µg de DNA dans l'agar. Celui-ci a été rincé dans 15 fois 10 ml de 2 × SSC à 60 °C, puis soumis au programme d'éluion décrit sous la figure 30. La radioactivité présente sous forme de C¹⁴ et de P³² dans les fractions éluées a été déterminée simultanément au moyen d'un compteur à scintillation liquide. Le T_m des hybrides DNA-RNA est le suivant : *stade 12* : RNA-C¹⁴ et RNA-P³² : 62 °C ; *stade 28* : RNA-C¹⁴ : 61,8 °C ; RNA-P³² : 60,8 °C ; *stade 42* : RNA-C¹⁴ : 62,7 °C. Aucune de ces différences n'est significative.

contradiction. La raison de cet état de choses apparaîtra par la suite.

2.3 VITESSE DE DÉGRADATION DU MESSAGEUR PRÉSENT DANS LES EMBRYONS EN VOIE DE DÉVELOPPEMENT.

Le pourcentage d'hybridation du RNA- P^{32} diminue au cours du développement embryonnaire [fig. 40 (b)]. Ceci suggère que

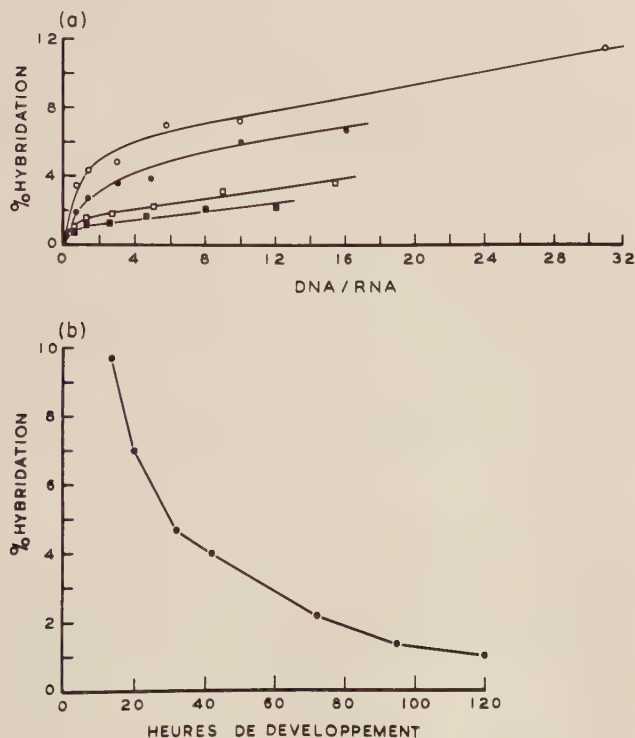


FIGURE 40.

Hybridation du RNA- P^{32} de neurulas (st. 17-20, $\circ-\circ$), d'embryons de stade bourgeon caudal (st. 22-24, $\bullet-\bullet$), de têtards actifs (st. 33-36, $\square-\square$) et de têtards différenciés (st. 42, $\blacksquare-\blacksquare$) avec des quantités croissantes de DNA emprisonné (a). Les pourcentages d'hybridation obtenus en (b) sont repris des courbes montrées en (a) et de 5 autres courbes non présentées, à l'endroit où ces courbes deviennent linéaires.

la fraction hybridable se renouvelle plus rapidement que la fraction non hybridable (sRNA et rRNA).

La vitesse de dégradation du mRNA a été étudiée chez la

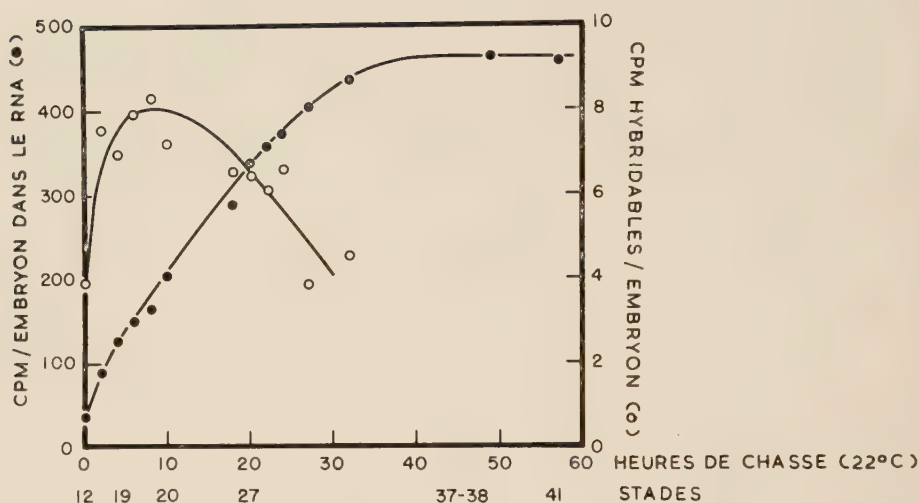


FIGURE 41.

Expérience de chasse faite avec des embryons de stade 12 (gastrulas). Quinze cents embryons ont été marqués au $C^{14}O_2$ pendant une heure, puis remis en milieu non radioactif et élevés pendant 60 heures. A la fin de l'expérience, les embryons avaient atteint le stade 41. Aux intervalles montrés en abscisse, des lots de 100 embryons ont été prélevés et leur RNA a été extrait. ●—● : Radioactivité totale présente dans le RNA. ○—○ : Cpm hybridés après incubation de 180 μg de RNA avec 90 μg de DNA dans l'agar. Toutes les valeurs sont présentées en cpm/embryon.

gastrula au moyen d'une expérience de chasse (*). Un grand nombre (1.500) de gastrulas ont été marquées au $C^{14}O_2$ pendant une heure ; les embryons ont ensuite été lavés et gardés en milieu non radioactif pendant 60 heures. A intervalles réguliers, des lots de 100 embryons ont été prélevés et leur RNA a été extrait. Comme le montre la figure 41, les embryons synthétisent du RNA marqué durant les 40 premières heures de chasse, ce qui signifie que, durant toute cette période, il existe un pool de précurseurs radioactifs. La chasse est terminée après 40 heures, puisque, par la suite, le nombre total de cpm présents dans le RNA ne change plus. A ce moment, toute la radioactivité incorporée à l'origine dans les précurseurs des acides nucléiques s'est accumulée dans le RNA de forme stable (sRNA et rRNA).

(*) On donne le nom d'« impulsion » à l'intervalle de temps pendant lequel les embryons séjournent dans le précurseur radioactif. On appelle « chasse » la durée pendant laquelle les embryons sont reportés en milieu non radioactif. Durant la chasse, le précurseur marqué incorporé durant l'impulsion initiale est progressivement éliminé.

Le nombre de coups présents dans le RNA hybridable augmente durant les 10 premières heures de chasse puis diminue rapidement (fig. 41). La fraction du RNA marqué qui s'hybride avec le DNA diminue constamment durant la chasse (fig. 42). La courbe de dégradation présentée sur la figure 42 indique que le mRNA possède une demi-vie de 2 heures.

Une expérience identique a été faite avec des embryons de stade 42 (têtards prêts à se nourrir, fig. 43 et 44). Ici encore, le pool

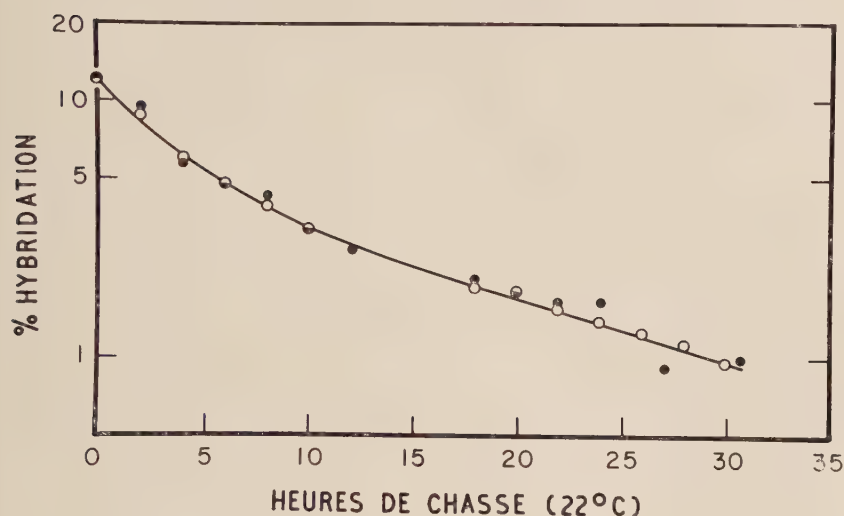


FIGURE 42.

Hybridation du RNA marqué pendant une heure au stade 12 et chassé pendant des durées croissantes. ●—● : Courbe expérimentale basée sur les résultats de la figure 41. ○—○ : Courbe théorique basée sur les données de la figure 41, en admettant que le mRNA possède une demi-vie de 2 heures. Cette courbe a été obtenue de la façon suivante. Le nombre de coups apparaissant dans le RNA durant chaque heure de chasse a été déterminé à partir des résultats de la figure 41. Durant chaque intervalle d'une heure, on suppose que 11,5 % de la radioactivité apparaissant dans le RNA s'incorpore dans la fraction hybridable. Cette supposition est justifiée par les résultats de la figure 37. En effet, 11,5 % des coups incorporés dans le RNA de gastrula après une heure de marquage s'hybrident avec le DNA. Ce pourcentage ne change pas de façon considérable entre le stade gastrula et les stades ultérieurs. Avec ces données, il est possible de déterminer le nombre de cpm présents dans la fraction hybridable au début de chaque intervalle d'une heure et subsistant à la fin de cette période. Ce calcul peut être fait en adoptant diverses demi-vies pour le mRNA. Le nombre de coups restant à la fin de chaque période d'une heure est ajouté à ceux qui apparaissent durant l'heure suivante et un nouveau bilan est établi après chaque intervalle d'une heure. On ne peut obtenir un bon accord entre la courbe calculée et la courbe expérimentale que si l'on adopte une demi-vie de 2 heures pour le mRNA.

des nucléotides reste radioactif longtemps (35 heures) après la fin de l'impulsion initiale (fig. 43). Le pourcentage de coups présents dans la fraction hybridable (fig. 44) diminue plus lentement que dans l'expérience faite sur les gastrulas (fig. 42). Il n'est pas possible de rendre compte de la courbe de dégradation présentée sur la figure 44 en adoptant une demi-vie de deux heures pour le mRNA, ou toute autre demi-vie plus longue ou plus courte. La seule manière d'expliquer les résultats est d'admettre que l'embryon

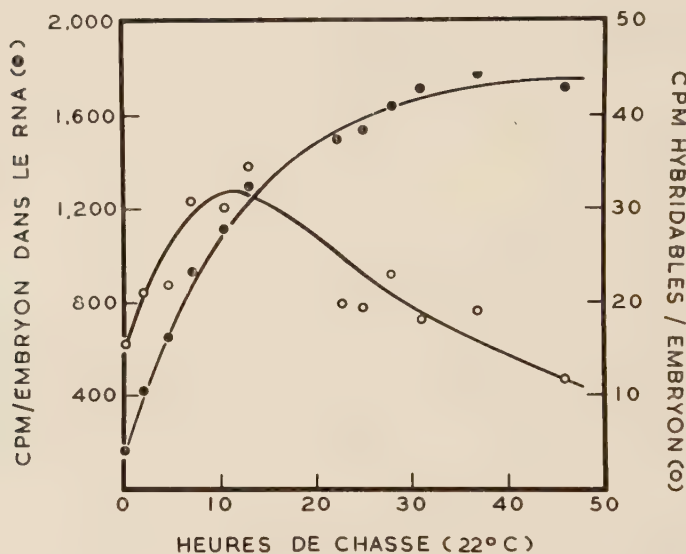


FIGURE 43.

Même expérience que sur la figure 41, mais faite avec des têtards différenciés (st. 42). ●—● : Radioactivité totale présente dans le RNA. ○—○ : Cpm hybridés après incubation de 50 μ g de RNA avec 70 μ g de DNA dans l'agar. Toutes les valeurs sont présentées en cpm/embryon.

avancé synthétise au moins deux classes de mRNA, possédant des demi-vies différentes. La chute rapide du pourcentage d'hybridation durant les premières heures de chasse suggère l'existence d'une classe de mRNA à renouvellement rapide (demi-vie : 1 heure). L'aplatissement ultérieur de la courbe de dégradation indique l'apparition de molécules stables de mRNA, qui sont marquées durant les premières heures de chasse et qui persistent pendant des périodes plus longues. Ces molécules ne peuvent pas être exclusivement du sRNA et du rRNA (qui s'hybrident aussi avec le DNA), car le niveau d'hybridation observé à la fin de l'expé-

rience demeure trop élevé ($\pm 1\%$) pour être expliqué de cette manière. Pour causer l'aplatissement de la courbe de dégradation après 2 à 3 heures de chasse (fig. 44), il suffit que, durant chaque intervalle d'une heure, une petite proportion ($1/5^e$ à $1/10^e$) du matériel hybridable soit stabilisée. Quand toute trace de radioactivité a disparu du pool des nucléotides, le pourcentage d'hybridation continue à décroître lentement. Cette diminution reflète la durée de vie du mRNA stable. L'imprécision de la courbe d'hybridation dans les 10 dernières heures de chasse ne permet cependant pas d'attribuer une demi-vie précise au mRNA de forme stable. Cette demi-vie doit être de l'ordre de 20 heures, sans qu'il soit possible de préciser davantage.

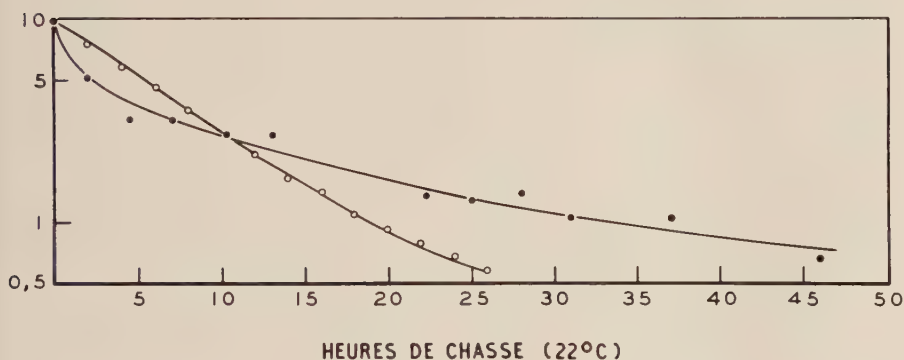


FIGURE 44.

Pourcentage d'hybridation du RNA marqué au stade 42 pendant une heure et chassé pendant des durées croissantes. ●—● : Courbe expérimentale basée sur les résultats de la figure 43. ○—○ : Courbe calculée basée sur les données de la figure 43, en supposant que le mRNA possède une demi-vie de 2 heures. Cette courbe a été obtenue comme indiqué sous la figure 42.

3. DISCUSSION.

Le RNA présent dans les fractions hybridées est formé en majeure partie de mRNA, mais il contient aussi une certaine quantité de sRNA et de rRNA. Le sRNA et le rRNA peuvent, en effet, s'hybrider avec une petite région du DNA ; ils sont donc présents dans les cellules en de nombreuses copies par site complémentaire (YANKOFSKY et SPIEGELMAN, 1962 ; RITOSSA et SPIEGELMAN, 1965 ; ATTARDI, HUANG et KABAT, 1965 ; GOODMAN et RICH, 1962 ; MAC FARLANE et FRASER, 1964). Cette particularité est illustrée par la figure 37 (a), où l'on observe

un faible pourcentage de liaison quand une grande quantité de DNA est hybridée avec du RNA d'œufs mûrs marqués au P^{32} durant l'oogenèse. Ce RNA est du RNA ribosomique quasi pur, car les oocytes en croissance synthétisent presque exclusivement ce type de RNA (DAVIDSON, ALLFREY et MIRSKY, 1964 ; BROWN et LITTNA, 1964 b).

La distinction entre mRNA d'une part et sRNA et rRNA d'autre part repose sur le fait que ces deux types de RNA sont représentés dans les cellules en un nombre très inégal de copies. Le RNA qui s'hybride aux rapports DNA/RNA peu élevés, c'est-à-dire dans la partie non linéaire des courbes d'hybridation [fig. 37 et 40 (a)], n'a besoin, pour trouver un site de liaison, que d'une faible quantité de DNA. Ce RNA est donc présent en peu de copies par site complémentaire ; *il est censé être du messenger* (HOYER et al., 1963). Le RNA qui ne s'hybride pas, à moins qu'on ne lui offre un grand excès de DNA [fig. 38 (b)], doit exister en de nombreuses copies. Celles-ci occupent tous les sites complémentaires du DNA si ce dernier est présent en faible quantité. Le RNA qui se lie seulement aux rapports DNA/RNA élevés, c'est-à-dire dans la partie linéaire des courbes d'hybridation [fig. 37 et 40 (a)] est probablement un mélange de sRNA + rRNA. Ces deux types de RNA sont, en effet, synthétisés activement durant la période de développement envisagée (BROWN et LITTNA, 1964 a). Le RNA hybridé en présence d'une faible quantité de DNA est donc formé en majeure partie de mRNA. Le RNA hybridé avec un grand excès de DNA contient en outre une proportion importante de sRNA et de rRNA.

La proportion de radioactivité qui s'incorpore d'une part dans le mRNA et d'autre part dans le sRNA et le rRNA ne change pas de manière considérable durant le développement embryonnaire (fig. 37). Environ 11,5 % du RNA synthétisé par la gastrula durant une impulsion d'une heure s'hybride facilement avec le DNA. Ce pourcentage s'élève à 14 chez les embryons plus avancés. La situation observée ici n'est pas différente de celle qui a été décrite chez les Bactéries (BOLTON et MAC CARTHY, 1962 ; MIDGLEY et MAC CARTHY, 1962), et chez les cellules cultivées de Mammifère (SCHIERRER et al., 1963 ; PERRY, SRINIVASAN et KELLEY, 1964), où le RNA marqué par une courte impulsion est aussi un mélange de mRNA et de rRNA (ou des précurseurs de celui-ci).

Le fait que les fractions hybridées contiennent, outre du mRNA, du sRNA et du rRNA permet de comprendre pourquoi la teneur en G + C de ces fractions augmente au cours du développement, lorsque les embryons sont exposés de façon continue au

P³² (tableau 9). Les jeunes embryons contiennent peu de sRNA et de rRNA nouvellement formés et par conséquent marqués (BROWN et LITTNA, 1964 a). Ces deux types de RNA fournissent donc très peu de coups aux fractions hybridées et ne peuvent influencer la composition en bases de ces fractions. La situation change dans la suite du développement. Le sRNA et le rRNA deviennent de plus en plus radioactifs, si bien qu'ils contaminent de façon croissante la fraction hybridable, lui apportant toujours davantage de RNA riche en G + C. Ceci suffit à expliquer pourquoi le contenu en G + C du RNA hybridable augmente au cours de l'ontogenèse. L'absence de changement dans la stabilité thermique du RNA hybridable marqué au C¹⁴ (fig. 39) montre que la composition en bases du mRNA ne varie pas d'un stade à l'autre.

Une différence dans la durée de vie a été constatée entre le mRNA de la gastrula et celui de l'embryon différencié. Ce dernier seul synthétise du mRNA de forme stable. Les durées de vie qui ont été attribuées au mRNA de différents stades doivent être considérées comme des estimations approximatives. Ces estimations reposent, en effet, sur la supposition que la quantité de mRNA qui apparaît durant chaque heure de chasse représente une proportion constante du nombre de coups synthétisés durant cette période (fig. 42). Dans l'expérience faite sur les gastrulas (fig. 41 et 42), ceci n'est vrai qu'en partie. Au début de l'expérience, 11,5 % du RNA apparaissant durant un intervalle d'une heure s'hybride aisément avec le DNA (fig. 37). Ce pourcentage monte à 14 après quelques heures, mais ne doit pas changer de façon notable durant la période de développement couverte par la seconde expérience de chasse. La présence de mRNA stable dans les embryons différenciés sera confirmée par les expériences décrites dans le chapitre suivant.

4. CONCLUSION.

Plusieurs propriétés des hybrides formés entre le DNA et le RNA provenant d'embryons de différents stades changent très peu au cours de l'ontogenèse. La vitesse de production du mRNA, comparée à celle du sRNA et du rRNA ne varie pas de manière considérable après la gastrulation. La stabilité thermique et, par tant, le contenu en G + C du mRNA ne change pas non plus de façon significative d'un stade à l'autre. Seule la vitesse de dégradation du mRNA change au cours du développement. Les embryons avancés contiennent du mRNA de forme stable. Ce dernier fait

défaut dans les embryons jeunes. L'uniformité dans la composition chimique globale du mRNA résulte probablement du fait que, à chaque stade, une proportion importante du DNA est transcrite sous forme de mRNA. Celui-ci aura donc toutes les chances de ressembler par sa composition globale au DNA, bien que la région du DNA copiée puisse varier d'un stade à l'autre. La validité de cette interprétation sera prouvée par les expériences de saturation présentées dans le prochain chapitre.

CHAPITRE III

TYPE DE MESSENGER TRANSCRIT DANS LES EMBRYONS EN CROISSANCE

Les expériences décrites jusqu'à présent ont montré qu'une partie importante du RNA synthétisé par les embryons durant une courte impulsion peut s'hybrider avec le DNA. Cette fraction hybridable possède plusieurs caractéristiques du messenger :

- 1) elle forme avec le DNA des hybrides stables, dont les caractères sont ceux de structures hélicoïdales ;
- 2) elle ressemble au DNA par sa composition chimique globale ;
- 3) elle se renouvelle rapidement avec une demi-période de quelques heures, tout au moins chez les jeunes embryons.

Ces expériences ne permettent pourtant pas d'établir si le mRNA présent dans les embryons de différents stades est complémentaire des mêmes régions du génome, ou de régions différentes. Cette question sera examinée dans le présent chapitre, en recourant à deux types d'expériences :

- 1) compétition entre les messagers synthétisés par les embryons de différents stades ;
- 2) saturation du DNA par le mRNA de différents stades.

1. MÉTHODES.

Marquage des embryons, extraction et hybridation du RNA.

Les embryons ont été marqués soit par le $C^{14}O_2$ soit par le P^{32} injecté dans la femelle. Le RNA a été extrait et hybridé avec le DNA comme décrit précédemment.

Extraction du RNA à partir de crapauds adultes.

Du RNA non marqué a été obtenu à partir d'un adulte entier en homogénéisant un petit crapaud (10 g) dans 200 ml de tampon

acétate 0,1 M, pH 5, contenant 5 µg/ml de sulfate de polyvinyle. Un broyeur Servall a été employé pour cette fin. Le RNA a été purifié par la méthode au SDS-phénol froid de BROWN et LITTNA (1961a). Le RNA a été extrait de cœurs et de foies adultes par le même procédé.

Détermination de l'activité spécifique du mRNA.

Pour connaître le nombre de sites génomiques qui peuvent être saturés par le mRNA d'un stade donné, il faut déterminer la quantité (en microgrammes) de RNA lié au DNA. Si tous les types de RNA présents dans les cellules avaient une radioactivité égale, une telle mesure serait facile. Pour transformer en microgrammes la radioactivité présente dans le RNA hybridé, il suffirait d'utiliser comme facteur de conversion l'activité spécifique du RNA global, puisque celle-ci serait la même que celle du mRNA. Malheureusement, un marquage uniforme de tous les types de RNA (mRNA, sRNA, rRNA) est impossible à obtenir chez les embryons d'Amphibiens, parce qu'il existe une grande quantité de RNA (4 µg chez le xénope) dans l'œuf indivis et que ce RNA ne peut pas être marqué durant le développement. Il est donc indispensable de mesurer *l'activité spécifique du RNA hybridable*, qui diffère totalement de celle du RNA global. Différents essais ont été tentés en vue d'obtenir le mRNA dans un état de pureté suffisant pour qu'une estimation puisse être faite de son activité spécifique. Tous ces essais ont été infructueux.

Une méthode indirecte, suggérée par BROWN et LITTNA (1966) a été utilisée. Dans cette technique, l'activité spécifique du mRNA est déterminée à partir de celle de ses précurseurs directs, à savoir les nucléosides-5'-phosphates. Ceux-ci sont isolés à partir de la fraction acido-soluble des extraits embryonnaires. Ces derniers sont traités au phénol comme décrit précédemment, de manière à purifier le RNA. Le surnageant obtenu après précipitation du RNA au moyen d'alcool éthylique est concentré dans le vide jusqu'à élimination complète de l'alcool. Le phénol précipite alors ; il est enlevé par quatre secouages successifs avec un volume égal d'éther. L'extrait est amené à pH 1, puis les nucléotides sont adsorbés par agitation à 0 °C pendant 30 minutes avec du charbon activé (100 mg de charbon pour 100 embryons). Le charbon est ensuite recueilli par centrifugation et soumis à une hydrolyse de 30 minutes dans HCl N à 100 °C. Ce traitement transforme les nucléosides-triphosphates en monophosphates. Après refroidissement, le charbon est

récupéré par passage sur Millipore, lavé à l'eau et agité à 37 °C pendant 2 heures dans la solution suivante : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 % ; alcool éthylique, 50 %. Ceci libère les nucléotides, lesquels sont alors débarrassés du charbon par centrifugation, concentrés et séparés par chromatographie sur colonne de Dowex AG 1 $\times$ 10 - formiate suivant le procédé de HURLBERT, SCHMITZ, BRUMM et POTTER (1954). La colonne est d'abord équilibrée avec de l'acide formique 4 N. L'échantillon est appliqué à pH 12. L'effluent est une solution d'acide formique dont la concentration croît de façon exponentielle de 0 N à 4 N. Les 4 nucléotides sont bien séparés par cette méthode (fig. 15), mais ils sont loin d'être purs, comme le montre la présence de contaminants, en particulier quand le marquage a été fait par le C^{14}O_2 . Pour obtenir une meilleure purification, les nucléotides sont repris, évaporés de manière à éliminer l'acide formique et chromatographiés séparément sur papier Whatman n° 1 dans le système eau-alcool éthylique-sulfate d'ammonium de LANE (1963). Après 6 à 8 heures, la chromatographie est arrêtée et les nucléotides sont élués du papier au moyen de NH_4OH 0,1 M. La concentration des nucléotides est déterminée dans les éluats par mesure de la densité optique à 260 m μ et leur radioactivité est mesurée après séchage d'une aliquote sur filtre Millipore. Ce dernier est placé dans une fiole avec 15 ml de fluor et compté dans un compteur à scintillation, si la radioactivité est due au C^{14} . S'il s'agit du P^{32} , le filtre est passé dans un compteur à gaz. Connaissant l'activité spécifique de chaque nucléotide, il est facile de calculer celle du mRNA, sachant que ce dernier contient 20 % de G et de C et 30 % de A et de U (BROWN et LITTNA, 1964 a et tableau 9).

Deux types différents de marquage ont été utilisés avant de mesurer l'activité spécifique des nucléotides.

1) *Orthophosphate- P^{32}* (1 mc) injecté dans la femelle avant l'ovulation. Dans ces conditions, le pool des nucléotides reste radioactif durant toute la durée du développement [BROWN et LITTNA, 1964 a et fig. 46 (a)]. Jusqu'au stade 30-33, l'activité spécifique du pool des nucléotides demeure constante et le RNA reste en équilibre avec lui. Après le stade 33, l'isotope se dilue rapidement par suite de la résorption du vitellus, qui libère une quantité considérable de phosphate inorganique. Après le stade 33, seules les molécules de mRNA à vie courte doivent rester en équilibre avec le pool. Si du mRNA stable existe, il doit conserver une activité spécifique supérieure à celle des nucléotides libres.

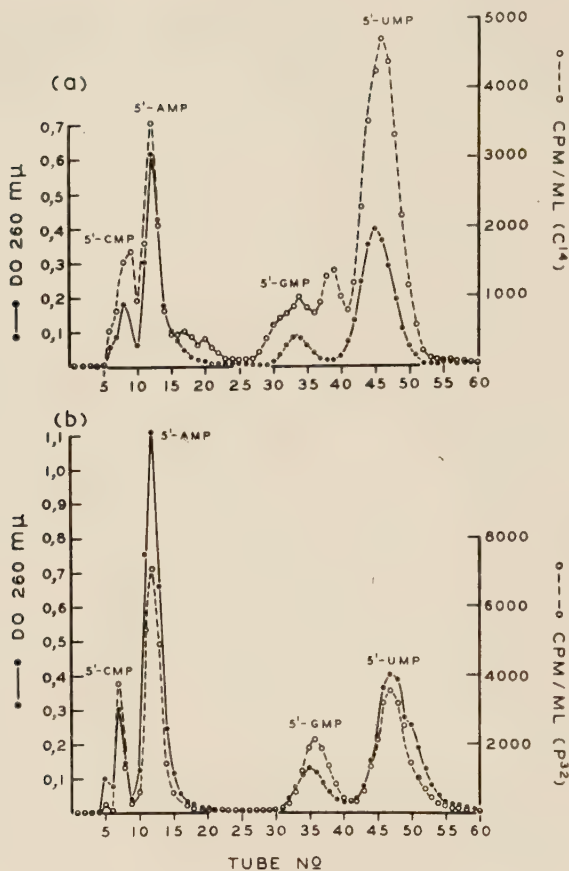


FIGURE 45.

Chromatographie sur colonne de Dowex-formate des 5'-mononucléotides purifiés à partir du pool acido-soluble de 1.000 embryons (st. 26-28). Dans un cas (a), les embryons ont été exposés au $C^{14}O_2$ pendant 1 heure et gardés pendant 10 heures en milieu non radioactif. Dans l'autre cas (b), les embryons ont été marqués au P^{32} depuis le début du développement. L'effluent est une solution d'acide formique dont la concentration varie de façon exponentielle de 0 N à 4 N. Volume total d'effluent : 250 ml. Des fractions de 2,5 ml ont été prélevées automatiquement. Les nucléotides ont été identifiés grâce à leurs caractéristiques spectrales (rapports d'absorption à 250, 260 et 280 mμ).

2) $C^{14}O_2$. Les embryons sont exposés au précurseur pendant une heure, débarrassés du CO_2 marqué et extraits, soit immédiatement, soit après 2-3 heures ou 10 heures de développement en milieu non radioactif. Comme le pool des nucléotides reste radioactif longtemps après la fin de l'impulsion dans le $C^{14}O_2$ (fig. 41 et 43), du RNA marqué est synthétisé pendant toute la durée de

l'expérience (1 heure, 3-4 heures et 11 heures respectivement). Après un marquage au $C^{14}O_2$, l'activité spécifique ne deviendra égale à celle de ses précurseurs qu'après un certain retard. Ce retard dépend de deux facteurs.

a) Vitesse de marquage des nucléotides. Dans une expérience d'impulsion-chasse, l'activité maximale des nucléotides est atteinte

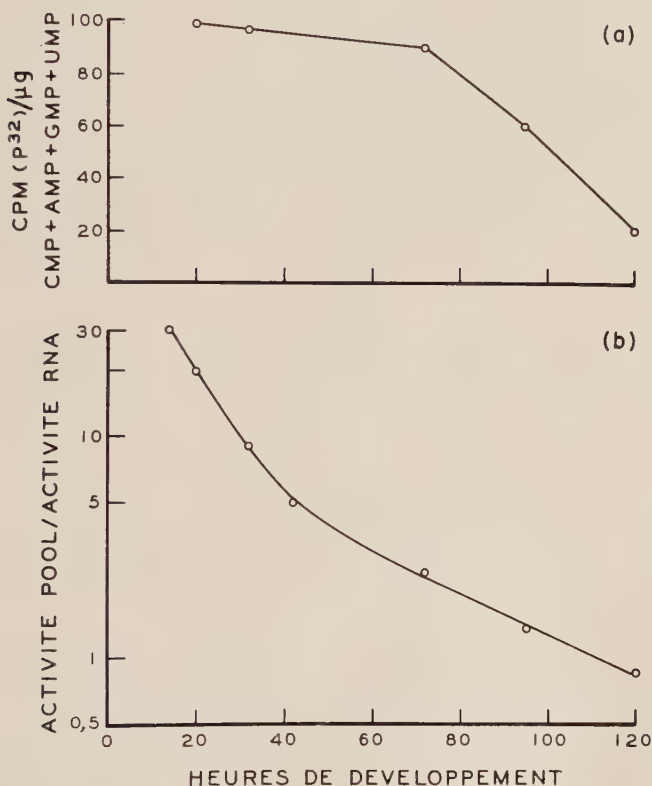


FIGURE 46.

Radioactivité du pool des 5'-mononucléotides dans les embryons en voie de développement (a). Le marquage a été assuré par injection d'une mC d'orthophosphate- P^{32} dans la femelle 12 heures avant le début de l'ovulation. L'activité spécifique a été déterminée pour chaque nucléotide après deux chromatographies successives sur Dowex et sur papier. L'activité globale est calculée en tenant compte du rapport suivant lequel les nucléotides s'incorporent dans le mRNA (20 % de G et 20 % de C, 30 % de A et 30 % de U). En (b) est montré comment évolue au cours du développement le rapport de l'activité des nucléotides libres à celle du RNA global après un marquage continu au P^{32} . L'activité spécifique des nucléotides est mesurée comme indiqué en (a). Celle du RNA total est déterminée en divisant le nombre de coups fournis par une aliquote de RNA par la quantité de RNA présente dans cette aliquote.

à la fin de l'impulsion. Durant la chasse, l'activité du pool décroît lentement, à raison de quelques pour cent par heure. Le plus grand changement dans l'activité spécifique a donc lieu durant la première heure du marquage.

b) Vitesse de marquage du mRNA. A la fin de la première heure de marquage, le mRNA n'aura une activité spécifique égale à celle de ses précurseurs que s'il possède une demi-vie infiniment courte. Comme la vie du messenger a une durée définie, son activité spécifique restera, au bout d'une heure, plus faible que celle du pool des nucléotides. Durant la chasse, le mRNA est synthétisé à partir des précurseurs dont l'activité spécifique reste relativement constante. Il est raisonnable de supposer que, après 11 heures, toutes les molécules instables de mRNA ont acquis la même activité spécifique que leurs précurseurs. Dans ce cas seulement, l'activité spécifique des nucléotides peut être utilisée pour estimer celle du mRNA.

Détermination de la quantité de mRNA présente dans les embryons.

Le pourcentage (en poids) de mRNA présent dans une préparation donnée de RNA a été déterminé au moyen des mesures suivantes :

- 1) pourcentage d'hybridation du RNA total avec le DNA ;
- 2) activité spécifique du mRNA, censée être la même que celle des 5'-nucléotides présents dans le pool acido-soluble ;
- 3) activité spécifique du RNA total.

Le niveau d'hybridation a été déterminé en incubant une quantité donnée de RNA avec des quantités croissantes de DNA (fig. 37 et 40). Le pourcentage de mRNA présent dans une préparation déterminée de RNA est obtenu en divisant le pourcentage d'hybridation (1) par le rapport de l'activité spécifique du mRNA (2) à celle du RNA total (3). Après un marquage au P^{32} , ce dernier rapport [(2) par (3)] diminue de façon continue au cours du développement [fig. 46 (b)].

2. PRINCIPE DES EXPÉRIENCES DE COMPÉTITION.

Dans toutes les expériences de compétition, une quantité fixe de RNA marqué (RNA de référence) est incubée avec une quantité fixe de DNA immobilisé et des quantités croissantes de RNA non radioactif (compétiteur). Quand le compétiteur et le RNA de référence sont identiques, le RNA non marqué remplace progressive-

ment le RNA marqué dans l'hybride et il en résulte une diminution apparente du pourcentage de liaison. La courbe de dilution ainsi obtenue doit être linéaire en coordonnées logarithmiques et présenter une pente de 45° , lorsque tous les sites complémentaires du DNA sont saturés. Si la quantité de RNA utilisée est insuffisante pour occuper tous les sites du DNA, de plus en plus de RNA s'hybride quand on ajoute des quantités croissantes de compétiteur. Par conséquent, la pente de la courbe de dilution sera inférieure à 45° . Si l'on ajoute assez de compétiteur, on arrivera éventuellement à saturer tous les sites complémentaires du DNA. A ce moment, la courbe de dilution montrera une cassure, après laquelle sa pente deviendra égale à 45° . Dans les expériences qui vont être décrites, une aliquote ou moins de RNA de référence sera hybridée avec une aliquote de DNA. La plupart du temps, ceci ne suffit pas

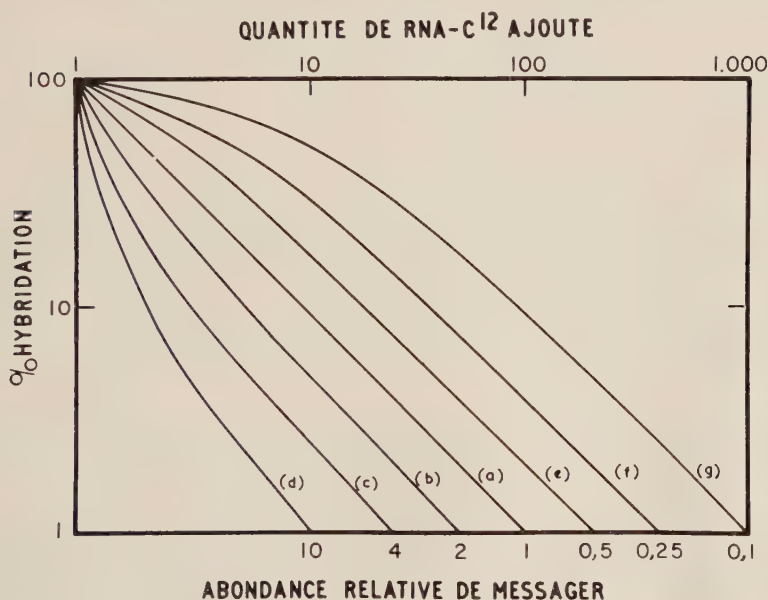


FIGURE 47.

Courbes de compétition attendues quand une préparation de RNA radioactif (RNA de référence) est comparée avec des préparations de RNA non marqué (compétiteur) qui diffèrent *quantitativement*, mais non qualitativement. Courbe (a) : courbe obtenue en diluant une aliquote de RNA de référence avec des quantités croissantes d'une préparation de RNA identique, mais non marquée. Courbes (b), (c) et (d) : courbes de compétition attendues lorsque le compétiteur contient un pourcentage plus élevé de mRNA (2,4 et 10 fois plus) que le RNA de référence. Courbes (e), (f) et (g) : courbes de compétition attendues lorsque le compétiteur contient une proportion plus faible de mRNA (2,4 et 10 fois moins).

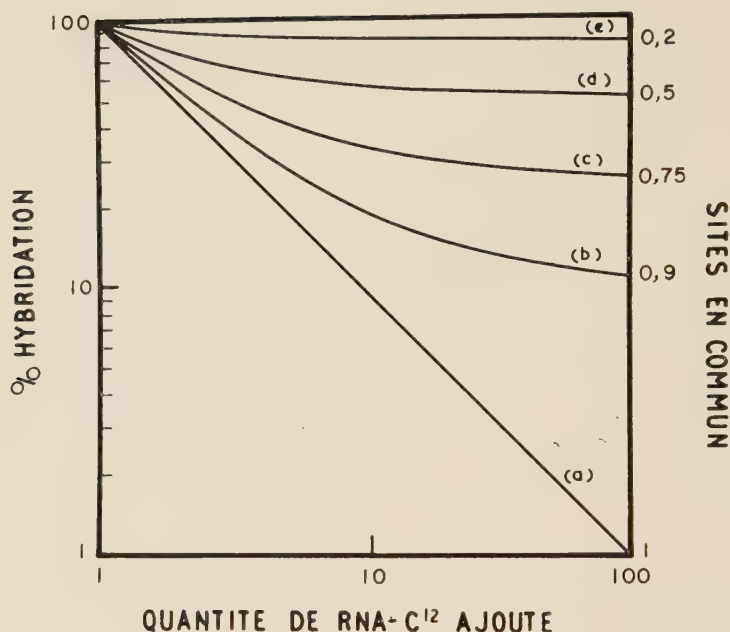


FIGURE 48.

Courbes de compétition attendues lorsqu'une préparation de RNA marqué est comparée avec des préparations non marquées de RNA qui diffèrent *qualitativement*, c'est-à-dire dont le mRNA contient des proportions variables de séquences nucléotidiques communes. Courbe (a) : courbe de dilution. Courbes (b) à (e) : courbes de compétition attendues lorsque le compétiteur possède de moins en moins de séquences nucléotidiques communes avec le RNA de référence.

pour saturer tous les sites complémentaires du DNA. Par suite, la pente des courbes de dilution sera inférieure à 45° .

Dans la plupart des expériences de compétition, le RNA compétiteur est différent du RNA de référence. Suivant que les différences entre les RNAs comparés sont qualitatives ou quantitatives, on peut obtenir des courbes de compétition d'allure très différente. Deux possibilités doivent être examinées.

1) Les séquences nucléotidiques sont les mêmes dans le RNA compétiteur et dans le RNA de référence. Chaque séquence commune est toutefois représentée en un nombre plus élevé de copies dans le compétiteur. Il est clair que la préparation la plus riche en mRNA sera plus compétitive que la préparation la plus pauvre. Une plus grande quantité de cette dernière doit être ajoutée pour obtenir le même niveau de compétition. Si la courbe de dilution a

une perte de 45° [fig. 47 (a)], la courbe de compétition aura une pente plus forte aux taux de dilution les plus bas, mais elle deviendra peu à peu parallèle à la courbe de référence quand on ajoute des quantités croissantes de RNA non radioactif [fig. 47, (b), (c) et (d)]. Dans le cas inverse, c'est-à-dire quand le RNA compétiteur contient moins de mRNA que le RNA de référence, la courbe de compétition sera plus aplatie aux faibles taux de dilution, mais présentera ensuite une pente de 45° [fig. 47, (e), (f) et (g)].

2) Le RNA compétiteur et le RNA de référence contiennent des séquences nucléotidiques différentes dans leur messenger. Si le mRNA présent dans le compétiteur est complémentaire de la moitié des sites génomiques représentés dans le RNA de référence, le niveau d'hybridation de ce dernier ne peut être réduit que de 50 %. Dans ce cas, la courbe de compétition et la courbe de dilution divergent de plus en plus quand on ajoute des quantités croissantes de RNA non marqué [fig. 48 (d)].

3. RÉSULTATS.

3.1 EXPÉRIENCES DE COMPÉTITION.

Compétition entre le RNA de stade 42 marqué durant une heure et le RNA d'autres stades.

Le RNA- C^{12} provenant d'œufs en segmentation n'est pas du tout compétitif vis-à-vis du RNA d'embryons différenciés (fig. 49). Le RNA de gastrulas et celui d'embryons plus avancés sont de plus en plus compétitifs vis-à-vis du RNA de stade 42. La forme des courbes de compétition suggère que les différences entre le RNA de stade 42 et le RNA d'embryons plus jeunes sont de nature qualitative (voir les courbes calculées de la fig. 48). L'existence de différences quantitatives n'est toutefois pas exclue. Aucune des séquences nucléotidiques du mRNA qui peuvent être marquées en une heure dans les têtards différenciés n'existe dans les œufs en segmentation, mais une proportion croissante de ces séquences nucléotidiques est présente dans les gastrulas et dans les embryons plus avancés.

Compétition entre le RNA- P^{32} de stade 39 et le RNA d'autres stades.

La courbe de dilution obtenue avec le RNA de têtards actifs marqués de façon continue au P^{32} est beaucoup plus aplatie (fig. 50, D) que la courbe de dilution obtenue avec du RNA

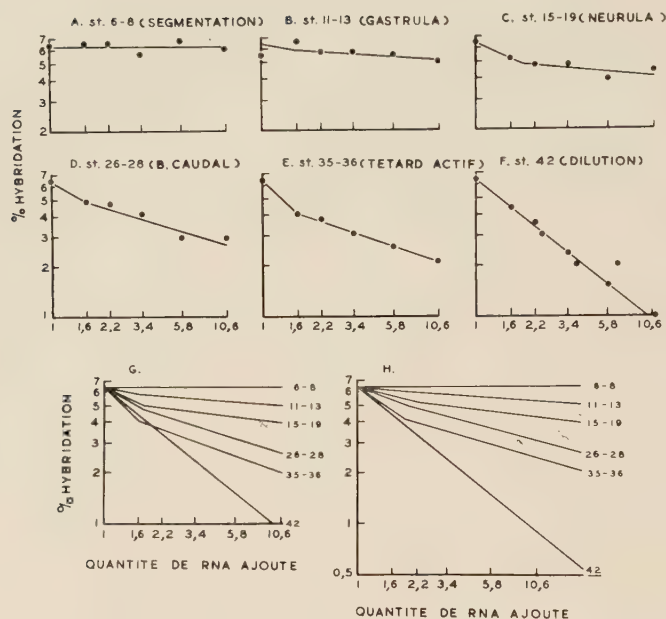


FIGURE 49.

Expérience de compétition entre du RNA de stade 42 marqué pendant 1 heure au $C^{14}O_2$ et du RNA de stades plus jeunes. Une aliquote (100 μ g) de RNA- C^{14} a été incubée avec 100 μ g de DNA dans l'agar et des quantités croissantes (60, 120, 240, 480 et 960 μ g) de RNA- C^{12} provenant d'embryons du même stade (F) ou d'autres stades (A à E). La figure G résume les résultats des figures A à F. Sur la figure G, la comparaison de stade à stade est basée sur l'addition à une aliquote de RNA radioactif de quantités croissantes de RNA provenant de divers stades. Or la quantité de RNA total présent dans les embryons change au cours du développement : elle passe de 4 μ g au stade 0 à 8 μ g au stade 42. Quatre μ g de RNA représentent donc un embryon au stade 0, mais seulement un demi-embryon au stade 42. Pour comparer le pouvoir compétiteur du mRNA fourni par un têtard différencié à celui du mRNA provenant d'un embryon plus jeune, il faut changer l'échelle d'abscisse de la figure G en tenant compte de la teneur variable en RNA des embryons en croissance. Cette correction est faite sur la figure H. Un pour cent d'hybridation = 12 cpm. Liaison non spécifique : 4 cpm.

d'embryons différenciés marqués durant une heure (fig. 49, F). Ceci montre qu'une plus grande quantité de RNA- P^{32} est nécessaire pour saturer les sites complémentaires du DNA. Le RNA d'œufs en segmentation n'interfère pas avec l'hybridation du RNA- P^{32} de stade 39 avec le DNA (fig. 50, A). Le RNA de neurulas et celui de stade bourgeon caudal sont de plus en plus compétitifs vis-à-vis du RNA de stade 42 (fig. 50, B et C). La forme des courbes de compétition suggère de nouveau que le mRNA présent dans les

embryons en voie de développement contient une proportion croissante de séquences nucléotidiques communes avec le mRNA de têtards différenciés (voir fig. 48).

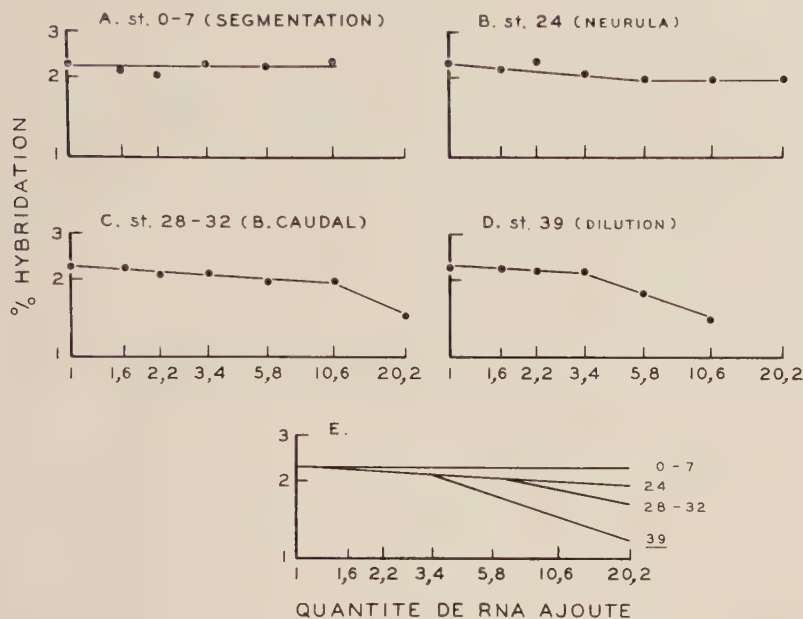


FIGURE 50.

Même expérience que sur la figure 49, mais faite avec du RNA de têtards actifs (st. 39), marqué de façon continue au P^{32} . Une aliquote (65 μ g) de RNA- P^{32} de stade 39 a été incubée avec 115 μ g de DNA dans l'agar et des quantités croissantes de RNA- P^{31} du même stade (D) ou d'autres stades (A à C). La figure E résume les résultats sur la base d'un individu (voir fig. 49). Un pour cent d'hybridation = 119 cpm. Liaison non spécifique : 5 cpm.

Compétition entre le RNA de stade 26-28 et le RNA d'autres stades.

Le RNA- C^{12} de gastrulas est peu compétitif vis-à-vis du RNA de stade bourgeon caudal marqué durant une courte période. La courbe de dilution et la courbe de compétition obtenues avec du RNA de gastrulas sont divergentes (fig. 51, B et D). Ceci montre que le mRNA de gastrulas et celui d'embryons de stade bourgeon caudal n'ont en commun qu'une partie de leurs séquences nucléotidiques (voir fig. 48). La courbe de compétition produite par le RNA de neurulas est parallèle à la courbe de dilution (fig. 51, C et D). Ceci donne à penser que le mRNA de neurulas

contient les mêmes séquences nucléotidiques que le mRNA de stade bourgeon caudal, mais en moins de copies (voir fig. 47). Le RNA non marqué d'embryons différenciés est plus compétitif vis-à-vis du RNA- C^{14} de stade 26-28 que ce dernier contre lui-même (fig. 51, D, comparée à E et F). Cette observation est confirmée par l'expérience présentée sur la figure 52. Le RNA de stade 42 y apparaît de nouveau plus compétitif que le RNA de stade 28. Ceci est vrai non seulement quand la comparaison est faite avec du RNA de stade bourgeon caudal marqué par une courte impulsion [fig. 52 (a)], mais aussi quand elle est faite avec du RNA marqué de façon continue au P^{32} [fig. 52 (b)]. On doit en conclure que tous les types de mRNA présents dans les larves de stade bourgeon caudal sont aussi présents dans les embryons plus avancés, mais en un nombre plus élevé de copies.

Le tableau 10 montre que le RNA non marqué de gastrulas est un compétiteur plus efficace vis-à-vis du RNA de stade bour-

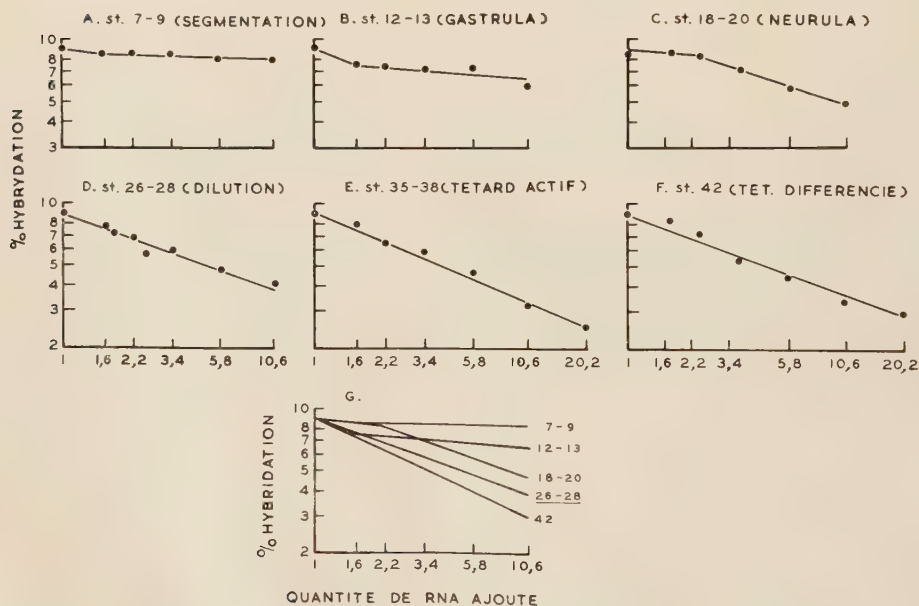


FIGURE 51.

Expérience de compétition entre du RNA d'embryons de stade bourgeon caudal (st. 26-28) marqué pendant une heure au $C^{14}O_2$ et du RNA d'autres stades. Une aliquote (75 μ g) de RNA- C^{14} de stade 26-28 a été incubée avec 90 μ g de DNA dans l'agar et des quantités croissantes de RNA- C^{12} du même stade (D) ou d'autres stades (A, B, C et E, F). La figure G résume les résultats sur la base d'un individu (voir fig. 49). Un pour cent d'hybridation = 47 cpm. Liaison non spécifique = 5 cpm.

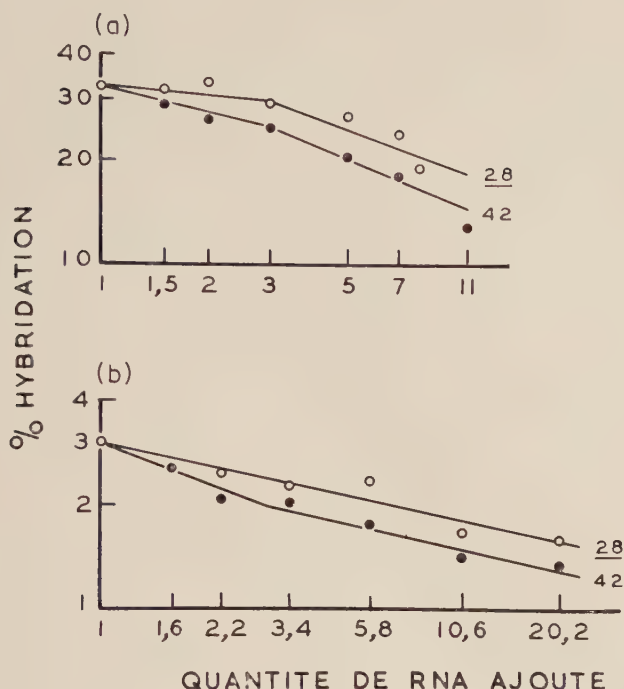


FIGURE 52.

Expériences de compétition entre du RNA marqué provenant d'embryons de stade bourgeon caudal (st. 28) et du RNA de têtards différenciés. La figure (a) montre la même expérience que sur la figure 51, D et F, mais réalisée en deux étapes. Deux mg de RNA (226.000 cpm) d'embryons de stade 28 marqués pendant une heure ont été préincubés avec 1 mg de DNA emprisonné dans l'agar. Le RNA hybridé a été récupéré, divisé en 14 aliquotes et dilué avec des quantités croissantes de RNA- C^{12} du même stade ou de stade 42. Chaque aliquote (correspondant à 140 μ g de RNA marqué) a été incubée avec 55 μ g de DNA dans l'agar. Sur la figure (b), du RNA- P^{32} (50 μ g ; 7.750 cpm) provenant d'embryons de stade 28 a été mis en compétition avec du RNA- P^{31} du même stade ou de stade 42. Quantité de DNA emprisonné : 80 μ g. Dans les deux expériences [(a) et (b)], les résultats sont présentés sur la base d'un individu (voir fig. 49).

geon caudal marqué pendant une heure au C^{14} que vis-à-vis du RNA du même stade marqué de façon continue au P^{32} . Le RNA de gastrulas a donc, semble-t-il, moins de séquences nucléotidiques communes avec le RNA- P^{32} qu'avec le RNA- C^{14} de stade bourgeon caudal. Ceci suggère que, au stade 26-28, le RNA marqué de façon continue est complémentaire de plus de sites génomiques que le RNA marqué par une courte impulsion.

TABLEAU 10

*Compétition entre du RNA non marqué de stade 12 (gastrula)
et du RNA-C¹⁴ ou P³² de stade 26-28 (bourgeon caudal)*

Mélange d'incubation		% hybridation	% compétition produite par le RNA non marqué
RNA de référence	RNA de compétition		
1 aliquote de RNA-C ¹⁴ marqué pendant 1 h. (stade 26-28)	—	9,0 (*)	0
»	10 aliquotes de RNA-C ¹² (st. 26-28)	3,9 (*)	100
»	10 aliquotes de RNA-C ¹² (st. 12)	6,4 (*)	52
1 aliquote (**) de RNA marqué de façon continue au P ³² (st. 26-28)	—	1,74	0
»	10 aliquotes de RNA-P ³¹ (st. 26-28)	0,82	100
»	10 aliquotes de RNA-P ³¹ (st. 12)	1,47 ; 1,43 (†)	32

(*) Résultats repris de la fig. 51.

(**) 31 µg de RNA (3.000 cpm) incubés avec 44 µg de DNA - agar.

(†) 2 expériences différentes.

Compétition entre le RNA de stade 15-19 et le RNA d'autres stades.

Le RNA extrait de neurulas marquées pendant une heure au C¹⁴O₂ se comporte essentiellement de la même manière que le RNA de stade bourgeon caudal, quand on le compare avec du RNA provenant d'embryons plus jeunes (fig. 53). Contrairement à ce qui a été observé dans l'expérience précédente, le RNA de têtards

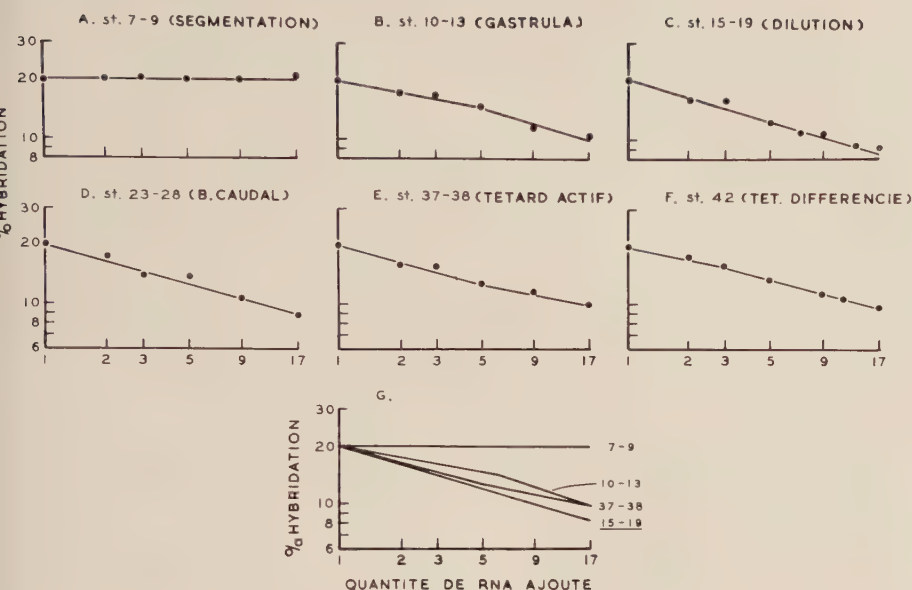


FIGURE 53.

Expérience de compétition entre du RNA de neurulas (st. 15-19) marqué pendant une heure au $C^{14}O_2$ et du RNA d'autres stades. Une aliquote (37 μ g) de RNA- C^{14} de neurula a été incubée avec 175 μ g de DNA dans l'agar et des quantités croissantes de RNA- C^{12} du même stade (C) ou d'autres stades (A, B, et D, E, F). La figure G résume les résultats sur la base d'un individu. Un pour cent d'hybridation = 17 cpm. Liaison non spécifique = 15 cpm.

différenciés est légèrement moins compétitif vis-à-vis du RNA de neurulas que ce dernier ne l'est contre lui-même.

Compétition entre le RNA de stade 10-12 et le RNA d'autres stades.

Le RNA d'œufs en segmentation n'entre pas en compétition avec le RNA de gastrulas marqué pendant une heure (fig. 54, A). Le RNA de neurulas et d'embryons plus avancés est moins compétitif que le RNA de gastrulas (fig. 54, C à F). Des observations semblables ont été faites à trois reprises différentes. Il faut en conclure que certaines séquences nucléotidiques sont présentes dans le mRNA de gastrulas, mais ne le sont plus dans le mRNA d'embryons plus âgés. La forme des courbes de compétition produites par le RNA extrait de têtards formés (fig. 54, G et H) suggère que les séquences nucléotidiques communes entre le RNA de gastrulas et celui de têtards différenciés sont plus abondantes chez les embryons avancés.

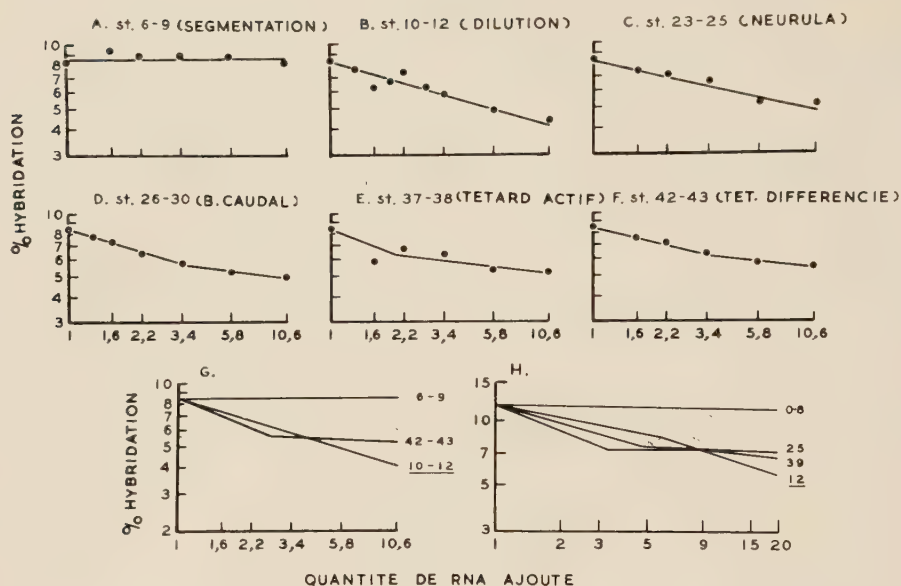


FIGURE 54.

Expériences de compétition entre du RNA de gastrulas (st. 10-12) marqué pendant une heure au $C^{14}O_2$ et du RNA d'autres stades. Une aliquote (108 μg) de RNA- C^{14} de gastrula a été incubée avec 115 μg de DNA dans l'agar et des quantités croissantes de RNA- C^{12} du même stade (B) ou d'autres stades (A et C à F). La figure G résume les résultats sur la base d'un individu. Un pour cent d'hybridation = 11 cpm. Liaison non spécifique = 4 cpm. La figure H résume les résultats d'une autre expérience faite dans les mêmes conditions.

Compétition entre le RNA embryonnaire et le RNA provenant de tissus adultes.

Dans les expériences décrites jusqu'à présent, il a été constaté que le mRNA extrait de têtards différenciés contient toutes ou presque toutes les séquences nucléotidiques présentes dans les embryons plus jeunes. Ceci suggère qu'il existe un certain degré d'homologie entre le mRNA embryonnaire et le mRNA présent dans les tissus adultes. Pour vérifier cette supposition, du RNA non marqué extrait de tissus adultes a été mis en compétition avec du RNA radioactif provenant d'embryons. Le RNA d'adulte entier est fortement compétitif vis-à-vis du RNA de gastrulas marqué par une courte impulsion (fig. 55). Une compétition moins forte est obtenue avec du RNA provenant de foie ou de cœur adulte. On arrive à des résultats très semblables en comparant du RNA

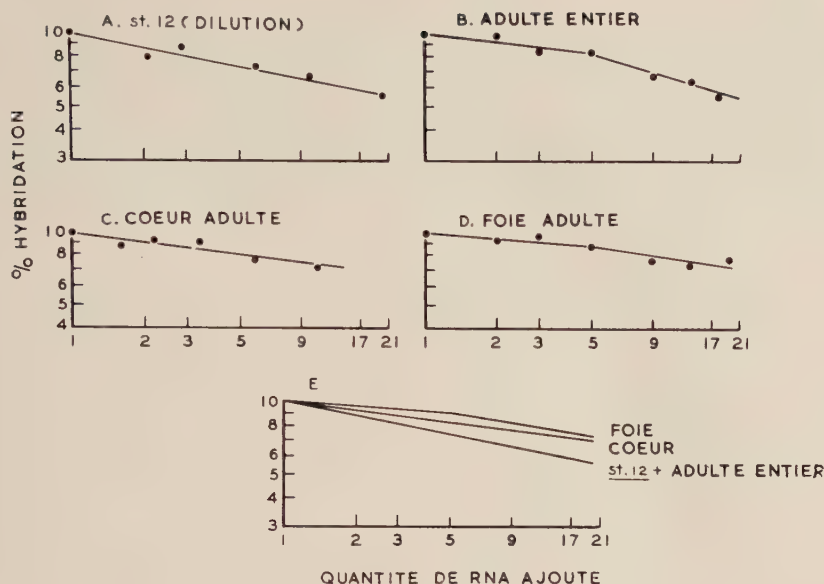


FIGURE 55.

Expériences de compétition entre du RNA de gastrulas (st. 12) marqué pendant 1 heure et du RNA extrait de cellules adultes. Une aliquote (55 μ g) de RNA-C¹⁴ a été incubée avec 200 μ g de DNA dans l'agar et des quantités croissantes de RNA-C¹² provenant de gastrulas (A), d'un adulte entier (B), ou de deux tissus adultes différents (C et D). La figure E résume les résultats. La courbe de dilution et la courbe de compétition obtenue avec du RNA adulte coïncident. Le pouvoir compétiteur du RNA provenant d'une cellule embryonnaire n'a pas pu être comparé à celui du RNA d'une cellule adulte, car la teneur en RNA des cellules adultes n'a pas été déterminée avec précision. La faible pente de la courbe de dilution est due à la grande quantité de DNA-agar employée. Un pour cent d'hybridation : 25 cpm. Liaison non spécifique : 5 cpm.

adulte avec du RNA d'embryons différenciés marqué soit par une courte impulsion, soit par une exposition continue au P³².

Il faut conclure de ces expériences qu'une grande partie du mRNA synthétisé par les jeunes embryons est identique à celui que l'on trouve dans les cellules adultes. La compétition importante produite par le RNA extrait de deux tissus différents indique, au surplus, que le mRNA commun aux cellules embryonnaires et aux cellules adultes est d'un type largement distribué dans l'organisme adulte.

3.2 EXPÉRIENCES DE SATURATION.

Le pourcentage du DNA transcrit sous forme de mRNA aux différents stades sera maintenant déterminé. Les expériences faites

au moyen de P^{32} seront décrites en premier lieu. Dans ce cas, toutes les molécules de mRNA synthétisées depuis le début du développement sont marquées. Le RNA synthétisé par les œufs mûrs durant le dernier jour avant l'ovulation ne s'hybride pas de façon significative avec le DNA [fig. 56 (a)]. Le RNA- P^{32} présent dans les gastrulas est complémentaire de 2,4 % de DNA

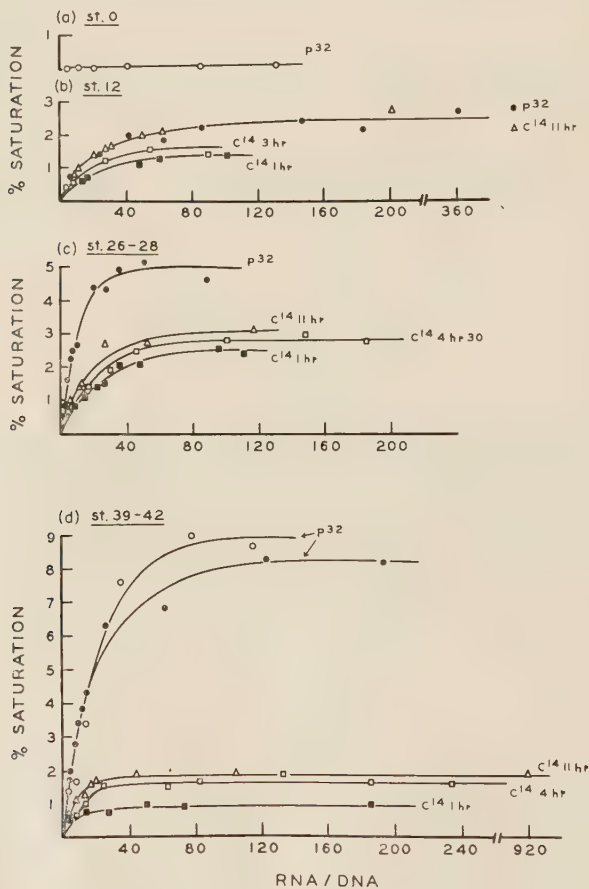


FIGURE 56.

Saturation du DNA avec du RNA de différents stades marqué pendant des durées variables. Le RNA utilisé dans l'expérience (a) provenait d'œufs non fécondés marqués par injection d'une mC de P^{32} dans la femelle un jour avant l'ovulation. Dans chaque expérience, 10 à 20 μ g de DNA retenus dans 30 à 60 mg d'agar ont été incubés avec des quantités croissantes de RNA. Les chiffres figurant en ordonnée se rapportent à la quantité de DNA restant dans l'agar à la fin de l'incubation. Cette quantité est inférieure de 5 à 10 % à la quantité de DNA emprisonné au départ. Volume total du milieu d'incubation : 100 à 200 μ l de $2 \times$ SSC.

[fig. 56 (b)]. Cinq % et 8 à 9 % du DNA peuvent être saturés respectivement par le RNA de stade bourgeon caudal [fig. 56 (c)] et par le RNA d'embryons différenciés [fig. 56 (d)]. Les embryons en voie de développement contiennent donc du RNA complémentaire d'un nombre croissant de sites génomiques.

Le RNA de gastrulas marquées pendant une heure au $C^{14}O_2$ ne sature que la moitié des sites génomiques qui sont accessibles au RNA- P^{32} de ce même stade [fig. 56 (b)]. Ceci signifie que, après une heure de marquage, une partie seulement du mRNA est radioactive. Le RNA- C^{14} marqué pendant 11 heures sature le même pourcentage du DNA (2,4 %) que le RNA- P^{32} du même stade. On peut en conclure que tout le mRNA présent dans les gastrulas devient radioactif après 11 heures d'exposition au $C^{14}O_2$. Par contre, le RNA d'embryons plus avancés marqué pendant 11 heures sature un pourcentage moins élevé du DNA que le RNA- P^{32} du même stade [fig. 56, (c) et (d)]. Ceci montre qu'une exposition de 11 heures au $C^{14}O_2$ ne suffit pas pour marquer tout le mRNA présent dans les embryons de stade bourgeon caudal et dans les têtards différenciés.

Le RNA- P^{32} et le RNA- C^{14} d'embryons avancés s'hybrident donc d'une manière très différente avec le DNA. Ceci suggère que, dans ces embryons, une partie de la population de mRNA « tourne » rapidement et se marque immédiatement au $C^{14}O_2$. Les autres molécules de mRNA sont stables et ne peuvent pas être marquées au $C^{14}O_2$, parce que les sites génomiques sur lesquels elles ont été transcrites ont cessé d'être actifs. Les expériences décrites sur la figure 57 confirment cette interprétation. Des embryons de 3 stades différents ont été exposés au P^{32} depuis le début du développement, puis marqués au C^{14} pendant 1 heure. Le RNA doublement marqué a été hybridé avec du DNA en présence de quantités croissantes de RNA radioactif du même stade. Au stade gastrula, les courbes de dilution obtenues avec le RNA- C^{14} et avec le RNA- P^{32} coïncident [fig. 57 (a)]. Les courbes fournies par le RNA- C^{14} et par le RNA- P^{32} de stade bourgeon caudal sont divergentes [fig. 57 (b)]. Elles le sont plus encore lorsque le RNA provient de têtards différenciés [fig. 57 (c)]. Dans les deux derniers cas, la courbe du RNA- C^{14} a une pente plus forte et plus proche du maximum (45°) attendu quand tous les sites complémentaires du DNA sont saturés. Une différence analogue apparaissait déjà dans les courbes de dilution obtenues séparément avec le RNA- C^{14} et le RNA- P^{32} de têtards différenciés (fig. 49 et 50). Il faut en conclure que le DNA est plus rapidement saturé par le RNA- C^{14}

que par le RNA-P³². Ceci ne peut se produire que si le RNA-C¹⁴ est complémentaire d'une longueur plus faible du DNA que le RNA-P³². A partir du stade bourgeon caudal, les embryons con-

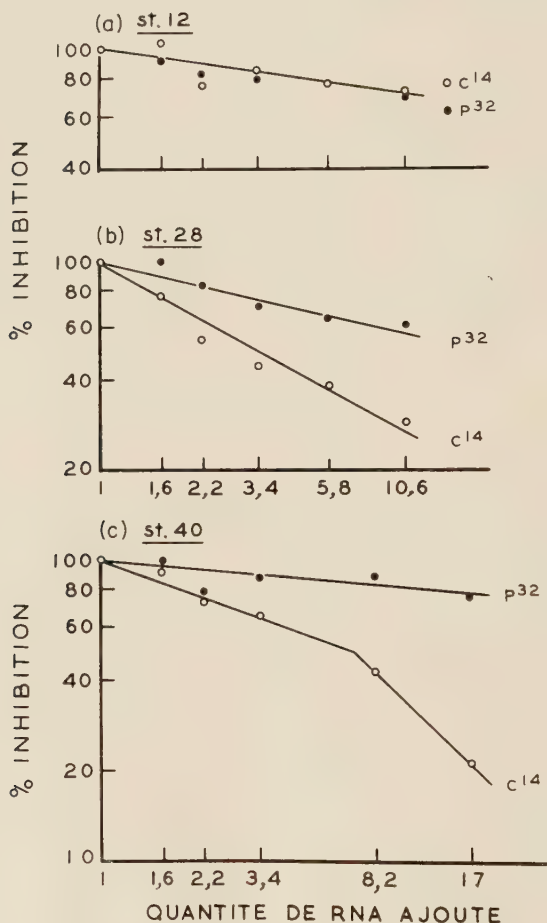


FIGURE 57.

Expériences de dilution isotopique faites au moyen de RNA doublement marqué. Le principe est le même que dans les expériences de compétition décrites précédemment (fig. 49 à 55). Des embryons marqués de façon continue au P³² ont été exposés au C¹⁴O₂ pendant 1 heure.

Expérience (a) : 1 aliquote (20 µg) de RNA doublement marqué de gastrulas a été incubée avec 115 µg de DNA-agar et des quantités croissantes de RNA non radioactif du même stade. Expérience (b) : 47 µg de RNA marqué provenant d'embryons de stade bourgeon caudal + 115 µg de DNA-agar et des quantités croissantes de RNA non marqué du même stade. Expérience (c) : 57 µg de RNA marqué de têtards différenciés + 115 µg de DNA-agar et des quantités croissantes de RNA non marqué du même stade.

tiennent donc du mRNA complémentaire de sites génomiques dont l'activité a cessé. Ce mRNA a été synthétisé aux stades antérieurs et ensuite stabilisé.

3.3 DEGRÉ D'HOMOLOGIE ENTRE LES MESSAGERS PRÉSENTS DANS LES EMBRYONS DE DIFFÉRENTS STADES.

Les expériences de saturation décrites sur la figure 56 montrent que le mRNA présent dans les embryons en train de se développer est complémentaire d'une région de plus en plus longue du DNA. Ces expériences n'indiquent cependant pas quel est le degré d'homologie entre les sites génomiques représentés aux différents stades sous la forme de mRNA. Ce point sera éclairci par les expériences de saturation en 2 étapes décrites dans les tableaux 11 et 12.

Dans la première expérience (tableau 11, A), une petite quantité de DNA dans l'agar a été préincubée avec un grand excès de RNA non marqué de gastrulas, de manière à saturer tous les sites génomiques exprimés à ce stade. Du RNA de stade bourgeon caudal marqué de façon continue au P^{32} , et au C^{14} pendant 1 heure a ensuite été ajouté au milieu d'incubation. La quantité de radioactivité liée sous forme de C^{14} et de P^{32} après la seconde incubation a été comparée à la quantité de radioactivité hybridée avec une quantité égale de DNA-agar non préincubé. En saturant le DNA au moyen de RNA de gastrula, on réduit de 55 % et de 40 % respectivement le niveau d'hybridation du RNA- C^{14} et du RNA- P^{32} de stade 28. Ceci montre qu'environ la moitié des sites génomiques accessibles au RNA- C^{14} de stade bourgeon caudal sont déjà exprimés dans la gastrula. Il paraît y avoir moins de séquences nucléotidiques communes entre le mRNA de gastrula et le mRNA de stade 28 marqué de façon continue. Ceci confirme les résultats des expériences de compétition décrites dans le tableau 10.

Une expérience semblable a été faite avec du RNA non marqué de stade bourgeon caudal et du RNA doublement marqué de têtards différenciés (tableau 11, B). Le RNA de stade bourgeon caudal réduit dans une proportion à peu près identique (deux tiers) le niveau d'hybridation du RNA- P^{32} et du RNA- C^{14} de stade 26-28. Ceci indique qu'environ les deux tiers des sites génomiques représentés sous forme de mRNA dans les embryons différenciés sont déjà exprimés au stade bourgeon caudal.

L'expérience décrite dans le tableau 12 détermine le pourcentage de séquences nucléotidiques communes entre le mRNA

TABLEAU 11

*Saturation du DNA en 2 étapes,
d'abord avec du RNA non marqué d'un stade,
puis avec du RNA doublement marqué d'un stade ultérieur*

Première incubation (24 h)	Deuxième incubation (16 h)	Cpm liés		% inhibition	
		C ¹⁴	P ³²	C ¹⁴	P ³²
<i>Exp. A.</i>					
—	RNA doublement marqué de st. 28 (b. caudal)	260	68	—	—
RNA non marqué de stade 12 (gastrula)	»	120	42	55	40
<i>Exp. B.</i>					
—	RNA doublement marqué de st. 42 (têt. différencié)	148	69	—	—
RNA non marqué de stade 26-28 (b. caudal)	»	52	27	65	61

CONDITIONS DE L'EXPÉRIENCE A :

1^{re} étape : 10 µg de DNA-agar ont été incubés avec 450 µg de RNA de st. 12 ;

2^e étape : 32 µg de RNA de stade 28 marqué de façon continue au P³² (6.200 cpm) et pendant 1 heure au C¹⁴ (5.600 cpm) ont été ajoutés au milieu d'incubation.

CONDITIONS DE L'EXPÉRIENCE B :

1^{re} étape : 10 µg de DNA-agar ont été incubés avec 1,4 mg de RNA de st. 26-28 ;

2^e étape : 200 µg de RNA de stade 42 marqué de façon continue au P³² (50.000 cpm) et pendant 1 heure au C¹⁴ (20.000 cpm) ont été ajoutés au milieu d'incubation.

TABLEAU 12

*Saturation du DNA en 2 étapes,
d'abord avec du RNA de stade 12 (gastrula),
puis avec du RNA de stade 39 (têtard actif)*

Première incubation (24 h)	Deuxième incubation (16 h)	Cpm liés	% inhi- bition
<i>Exp. A.</i>			
—	RNA-P ³² st. 39 (**)	215	—
RNA-P ³¹ st. 12 (*)	»	177	18
RNA-P ³¹ st. 39 (†) (témoin)	»	37	83
<i>Exp. B.</i>			
—	RNA-C ¹⁴ st. 12 (†††)	89	—
RNA-C ¹² st. 39 (††)	»	21	76

(*) 1,1 mg de RNA incubé avec 16 µg de DNA-agar.

(**) 900 µg de RNA marqué de façon continue (72.000 cpm).

(†) 1,3 mg de RNA incubé avec 16 µg de DNA-agar.

(††) 1,3 mg de RNA incubé avec 9 µg de DNA-agar.

(†††) 360 µg de RNA marqué pendant 1 heure (3.950 cpm).

de gastrulas et celui d'embryons différenciés. Le RNA de gastrula réduit d'environ 20 % le niveau d'hybridation entre le DNA et le RNA de stade 39 marqué de façon continue (exp. A, 2 premières lignes). Parmi les sites génomiques représentés sous forme de RNA complémentaire chez l'embryon différencié, une petite partie est donc déjà transcrite dans la gastrula. Par ailleurs, le RNA de têtard inhibe fortement l'hybridation du RNA de gastrula avec le DNA (exp. B). Le faible degré de liaison (21 cpm) qui subsiste entre le RNA de gastrula et le DNA saturé au préalable par du RNA de têtards différenciés pourrait être dû à des sites génomiques exprimés dans la gastrula et non exprimés dans les embryons différenciés. Toutefois, cette liaison résulte plus vraisemblablement du fait que tous les sites complémentaires du DNA n'ont pas été couverts durant la première incubation. L'expérience de contrôle présentée sur le tableau 12 A (1^{re} et 3^e lignes) est en faveur de cette dernière explication, puisque le DNA préincubé avec un grand excès de RNA de stade 39 est encore capable, durant une seconde incubation, d'accepter une petite quantité de RNA de la même origine.

3.4 ORIGINE DU MESSAGER INSTABLE PRÉSENT DANS LES EMBRYONS DIFFÉRENCIÉS.

Le RNA synthétisé pendant une courte impulsion par les têtards différenciés est apparemment transcrit sur un petit nombre de sites génomiques (fig. 56). Avant de tirer des conclusions de cette constatation, il est nécessaire de s'assurer que tous les tissus des têtards différenciés sont accessibles au traceur et que la pénétration de celui-ci n'est pas limitée par des phénomènes de perméabilité ou de diffusion. Le $C^{14}O_2$ a été utilisé pour toutes les expériences de marquage court. Il pourrait se faire que les embryons deviennent de moins en moins perméables au CO_2 à mesure qu'ils se développent. De la sorte, les organes les plus aisément accessibles par diffusion directe seraient les seuls à être marqués dans les têtards différenciés. Or le mRNA synthétisé dans les cellules animales possède une certaine spécificité tissulaire (SCHOLTISSECK, 1962; MAC CARTHY et HOYER, 1961; KIDSON et KIRBY, 1964). Le mRNA marqué par une courte impulsion dans les embryons avancés pourrait donc ne provenir que des tissus superficiels et n'être complémentaire que d'une partie des sites génomiques réellement transcrits durant la période de marquage. Pour vérifier ceci, des embryons de stade 42 ont été exposés au $C^{14}O_2$ pendant 1 heure, fixés et autoradiographiés. Il apparaît que tous les organes des embryons sont radioactifs, bien que certains d'entre eux (système nerveux, tube digestif) soient beaucoup plus marqués que certains autres (somites). Ces différences reflètent probablement l'activité métabolique des tissus (surtout la synthèse protéique) plutôt que leur accessibilité au traceur, puisqu'on observe des différences de même ordre quand les organes de l'embryon sont disséqués et exposés séparément au traceur (fig. 2 et 6). On peut en conclure que si le RNA synthétisé pendant une courte impulsion par les têtards différenciés ne sature qu'une courte région du DNA, ceci n'est pas dû à une mauvaise pénétration du traceur.

3.5 QUANTITÉ DE MESSAGER PRÉSENT DANS LES EMBRYONS DE DIVERS STADES.

Le tableau 13 décrit la quantité de mRNA qui peut être marqué au P^{32} ou au C^{14} dans les embryons de divers stades. Chez les embryons de stade bourgeon caudal et chez les têtards différenciés, moins de mRNA est marqué par le $C^{14}O_2$ que par le P^{32} . La figure 58 montre comment évolue la teneur en mRNA- P^{32} des embryons au cours du développement. Très peu de mRNA est

TABLEAU 13

Quantité de mRNA présent dans les embryons de divers stades

Stade	Type de marquage	mug de mRNA (*) marqué par embryon	% saturation du DNA (**)
12	P ³²	12	2,4
(gastrula)	C ¹⁴ O ₂ 11 h	13	2,4
26 - 28	P ³²	34	5,0
(b. caudal)	C ¹⁴ O ₂ 11 h	24	3,0
39 (têt. actif)	P ³²	78	8,5
42 (têt. différencié)	C ¹⁴ O ₂ 11 h	42	1,8

(*) Ces quantités de mRNA ont été mesurées comme indiqué dans les méthodes.

(**) Résultats repris de la figure 56.

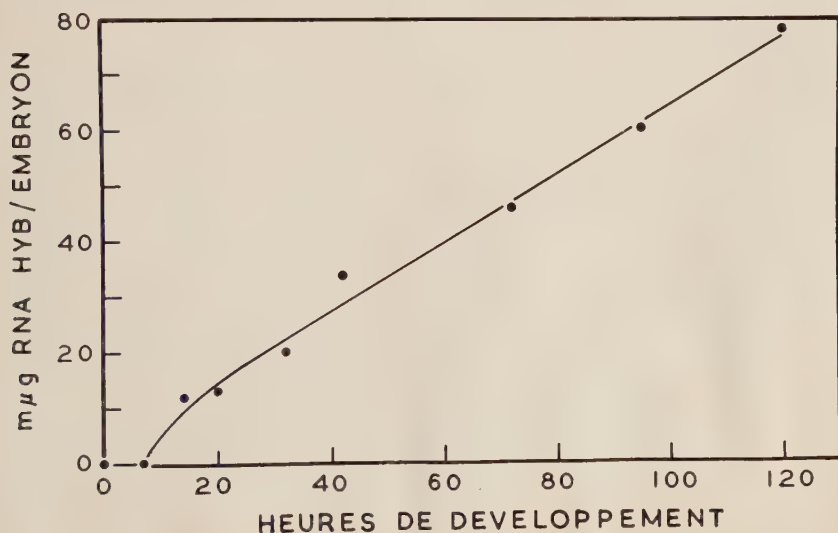


FIGURE 58.

Quantité de RNA hybridable marqué dans les embryons en croissance exposés au P³² depuis le début du développement.

synthétisé durant la segmentation. La synthèse de mRNA démarre brusquement au début de la gastrulation. Chez la gastrula avancée, environ 0,3 % du RNA total peut être hybridé avec le DNA. Ce pourcentage s'élève à 0,7 % au stade bourgeon caudal et 1,1 % à la fin du développement. Comme l'indique le tableau 13, la quantité de mRNA qui peut être marqué par le P^{32} mais non par le $C^{14}O_2$ augmente au cours de l'ontogenèse. En d'autres mots, la population de mRNA contient une proportion croissante de molécules stables.

4. DISCUSSION.

4.1 VALIDITÉ DE LA MÉTHODE EMPLOYÉE.

Dans toutes les expériences de compétition, une aliquote ou moins de RNA de référence a été incubée avec une aliquote de DNA. Les sites génomiques saturés dans ces conditions ne représentent qu'une petite partie de tous ceux qui peuvent être occupés par le mRNA d'un stade donné (fig. 56). Les expériences de compétition sont donc réalisées en conditions non saturantes. Ceci conduit à quelque ambiguïté dans les résultats, car le pouvoir compétiteur d'une préparation donnée de RNA dépend de deux facteurs :

- 1) nombre de séquences nucléotidiques communes avec le RNA de référence ;
- 2) nombre de copies en lesquelles les séquences communes sont présentes dans le RNA de référence et dans le RNA compétiteur.

La forme des courbes de compétition (voir fig. 47 et 48) permet cependant de distinguer si les différences entre les RNAs comparés sont avant tout quantitatives ou qualitatives. La saturation incomplète du DNA a aussi comme résultat que la plupart des courbes de dilution ont une pente réduite (fig. 50, 53, 54 et 55). Ceci diminue le degré de précision des expériences. Ces limitations sont communes à toutes les expériences de compétition décrites jusqu'à présent (HOYER et al., 1961 ; MAC CARTHY et HOYER, 1961 ; HALL, NYGAARD et GREEN, 1964 ; ARONSON, 1965). Malgré cela, toutes les conclusions importantes tirées des expériences de compétition ont été confirmées par les expériences de saturation. Dans les deux types d'expériences, il est apparu que :

- 1) le mRNA d'œufs indivis ou d'œufs en segmentation n'a pas de séquences nucléotidiques communes avec le mRNA de gastrulas ou d'embryons plus avancés ;

- 2) la plupart des séquences nucléotidiques représentées dans le mRNA de la gastrula sont aussi représentées dans le mRNA d'embryons plus âgés ;
- 3) le mRNA provenant d'embryons en voie de développement est complémentaire d'un nombre croissant de sites génomiques.

La longueur du DNA qui a pu être saturée par le mRNA de chaque stade ne doit pas être considérée comme une mesure valable en grandeur absolue. Pour plusieurs raisons, ce genre de mesure ne peut être utilisé que pour des comparaisons de stade à stade. Tout d'abord, la durée d'incubation a été limitée à une nuit, ce qui ne suffit pas pour assurer le niveau maximal d'hybridation entre le DNA et le RNA (fig. 25). Au surplus, des régions d'appariement imparfait sont incluses dans les hybrides formés à la température d'incubation normale (fig. 31). Ceci contribue à surestimer le niveau d'hybridation du RNA. Une complication supplémentaire intervient dans les expériences de saturation faites avec du RNA- P^{32} provenant d'embryons plus avancés que le stade 30. Après ce stade, l'activité spécifique du mRNA, déterminée à partir de celle des nucléotides libres, est probablement sous-estimée. En effet, l'activité spécifique du pool des nucléotides diminue rapidement durant cette phase du développement [fig. 46 (a)]. Les molécules stables de mRNA synthétisées avant le stade 30 doivent conserver une activité supérieure à celle des nucléotides libres des stades ultérieurs. Ce facteur conduit à surestimer le pourcentage du DNA accessible au RNA de têtards différenciés. Il reste toutefois établi que le RNA d'embryons différenciés sature un plus grand pourcentage du DNA que le RNA de stade bourgeon caudal. Après qu'il a été saturé par du RNA non marqué de stade 26-28, le DNA reste accessible sur une certaine longueur ($\pm 2,5 \%$) au RNA provenant d'embryons différenciés (tableau 11, B). Si un seul brin du DNA est copié dans les cellules animales comme c'est le cas chez les Bactéries (MAC CARTHY et BOLTON, 1964) et chez les Bactérophages (BAUTZ et HALL, 1962 ; GREEN, 1961 ; HAYASHI, HAYASHI et SPIEGELMAN, 1964) il faut conclure que 10 à 20 % du nombre total des gènes sont transcrits sous la forme de messenger dans les cellules du têtard différencié. Ce messenger représente à peu près 1 % du RNA total présent dans l'embryon.

4.2 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS.

Les limitations qui viennent d'être exposées n'affectent pas les conclusions essentielles qui peuvent être tirées des expériences

décrites dans le présent mémoire. Comme les expériences de compétition et les expériences de saturation ont donné des résultats concordants, il est possible de combiner tous ces résultats de manière à obtenir une vue plus claire de la façon dont évolue la synthèse de RNA messenger au cours du développement embryonnaire. La *figure 59* résume les résultats des expériences de compétition (fig. 49 à 54) et des expériences de saturation (fig. 56).

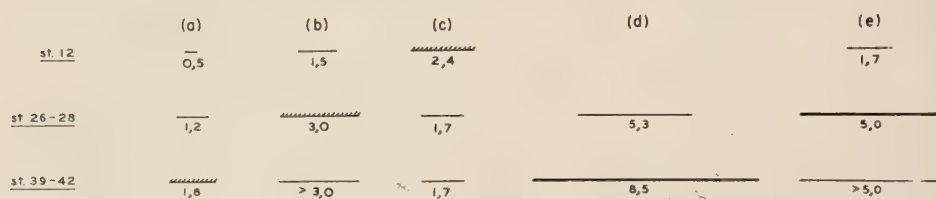


FIGURE 59.

Diagramme résumant les résultats des expériences de compétition et des expériences de saturation. Dans chaque secteur du diagramme, une ligne hachurée (//) ou une ligne épaisse représente les sites génomiques complémentaires du mRNA d'un stade donné (stade de référence). La longueur de chacune de ces lignes est proportionnelle au pourcentage du DNA qui peut être saturé par le RNA considéré. Les séquences nucléotidiques qui, aux autres stades, sont complémentaires des sites exprimés au stade de référence sont figurées par des lignes minces. Les sections (a) à (c) se rapportent au RNA- C^{14} , c'est-à-dire au RNA se renouvelant rapidement. Les sections (d) et (e) se rapportent au RNA marqué de façon continue au P^{32} . La manière dont le diagramme a été établi est décrite dans le texte (section 4,2).

La *figure 59 (a)* reprend les résultats de l'expérience de compétition entre le RNA de stade 42 marqué par une courte impulsion et le RNA de stades moins avancés (fig. 49). Les expériences de saturation ont montré que le RNA instable de stade 42 est complémentaire de 1,8 % du DNA (fig. 56). Comme le RNA d'embryons plus jeunes n'est que partiellement compétitif vis-à-vis du RNA de stade 42, ces embryons doivent contenir ou bien :

- 1) du RNA complémentaire d'une fraction des sites génomiques exprimés au stade 42 (voir fig. 48), au bien :
- 2) du mRNA complémentaire des mêmes sites génomiques, mais présent en moins de copies (voir fig. 47), ou bien encore :
- 3) du mRNA moins abondant et moins diversifié.

La forme des courbes de compétition, qui divergent par rapport à la courbe de dilution (fig. 49), ainsi que l'expérience de double saturation décrite dans le tableau 11, B excluent la possibilité (2).

Le tableau 11, B montre qu'environ deux tiers des sites génomiques transcrits durant 1 heure au stade 42 sont déjà exprimés au stade bourgeon caudal. Ceci est en bon accord avec les résultats de l'expérience de compétition (fig. 49), où il apparaît que le RNA de stade 26-28 peut réduire de deux tiers environ le niveau d'hybridation entre le DNA et le RNA de stade 42. C'est pourquoi une ligne indiquant 1,2 % du DNA représente les sites génomiques exprimés au stade 26-28. Par ailleurs, le RNA de stade 12 inhibe d'à peu près un quart le degré de liaison entre le DNA et le RNA de stade 42 (fig. 49). Cet effet n'est probablement pas dû au contenu en mRNA plus faible de la gastrula (tableau 13), puisqu'un grand excès de RNA de gastrula réduit de 18 % seulement le niveau d'hybridation entre le DNA et le RNA de stade 39 (tableau 12). Les sites génomiques actifs à la fois dans la gastrula et dans le têtard différencié correspondent donc à environ 0,5 % du DNA.

La *figure 59 (b)* résume les résultats de l'expérience de compétition entre le RNA de stade 26-28 marqué par une courte impulsion et le RNA d'autres stades (fig. 51). Trois pour cent du DNA peuvent être saturés par le RNA instable de stade 26-28 (fig. 56). Le RNA de gastrula réduit de moitié le niveau d'hybridation entre le DNA et le RNA de stade bourgeon caudal (fig. 51). Ceci est confirmé par l'expérience de saturation en 2 étapes décrites dans le tableau 11, A. A peu près la moitié des sites génomiques (c'est-à-dire 1,5 % du DNA) représentés sous forme complémentaire dans le RNA instable de stade 26-28 est donc déjà exprimée dans la gastrula [fig. 58 (b), 2 premières lignes]. Par ailleurs, le RNA de têtards différenciés est plus compétitif que le RNA de stade bourgeon caudal [fig. 51 et 52 (a)]. Ceci montre que tous les sites génomiques actifs au stade bourgeon caudal sont aussi représentés sous la forme de mRNA dans les embryons différenciés [fig. 59 (b), 2 dernières lignes].

La *figure 59 (c)* est basée sur les expériences de compétition entre le RNA de gastrula et le RNA d'embryons plus âgés (fig. 54). Le mRNA de stade 12 est complémentaire de 2,4 % du DNA (fig. 56). Puisque le RNA de stade bourgeon caudal et celui de têtards différenciés sont moins compétitifs que le RNA de gastrula, certains sites génomiques doivent être actifs au stade gastrula et n'être plus représentés sous la forme de RNA complémentaire chez les embryons plus avancés. Environ deux tiers des séquences nucléotidiques présentes dans le mRNA de gastrula le sont aussi dans le mRNA de stades ultérieurs (fig. 54, G et H). Ceci est illustré par les deux dernières lignes de la figure 59 (c).

La *figure 59 (d)* résume les données de l'expérience de compétition entre le RNA-P³² d'embryons différenciés et le RNA de stade bourgeon caudal (fig. 50). Les résultats de cette expérience et ceux de l'expérience de saturation en 2 étapes (tableau 11, B) sont en bon accord ; ils montrent qu'un peu plus de 60 % des sites génomiques (c'est-à-dire 5,3 % du DNA) représentés sous forme de mRNA au stade 39 sont déjà exprimés au stade bourgeon caudal.

La *figure 59 (e)* est déduite des expériences de compétition entre le RNA-P³² de stade bourgeon caudal et le RNA d'autres stades [tableau 10 et fig. 52 (b)], ainsi que de l'expérience de saturation décrite dans le tableau 11, B. Parmi les séquences nucléotidiques formant le mRNA de stade 26-28, 30 à 40 % (correspondant à 1,7 % du DNA) sont déjà présentes dans la gastrula. Toutes ces séquences sont représentées dans le mRNA de l'embryon différencié [fig. 52 (b)].

Les résultats de la *figure 59* sont présentés sous une forme plus concise sur la *figure 60*. Dans ce diagramme, la longueur totale des lignes correspondant à chaque stade est proportionnelle au pourcentage du DNA qui peut être saturé par le RNA-P³². La partie hachurée de chaque ligne se rapporte à la longueur du DNA accessible au RNA instable. Les portions de lignes situées les unes en dessous des autres correspondent aux séquences nucléotidiques communes au RNA des stades considérés. La position relative des

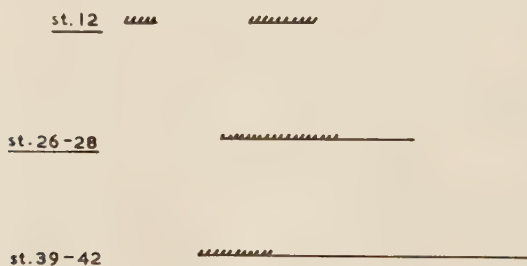


FIGURE 60.

Mêmes résultats que sur la *figure 59*, mais présentés de façon plus concise. La longueur totale des segments représentant chaque stade correspond au pourcentage du DNA qui peut être saturé par le RNA marqué de façon continue au P³². Les segments portant des hachures (//) correspondent à la longueur du DNA accessible au RNA marqué au C¹⁴ pendant 11 heures. Ces données sont tirées directement de la *figure 56*. Les portions de lignes placées les unes en dessous des autres correspondent aux séquences nucléotidiques communes au mRNA de divers stades. L'importance du recouvrement entre les sites génomiques exprimés aux différents stades a été déterminée à partir des indications de la *figure 59*.

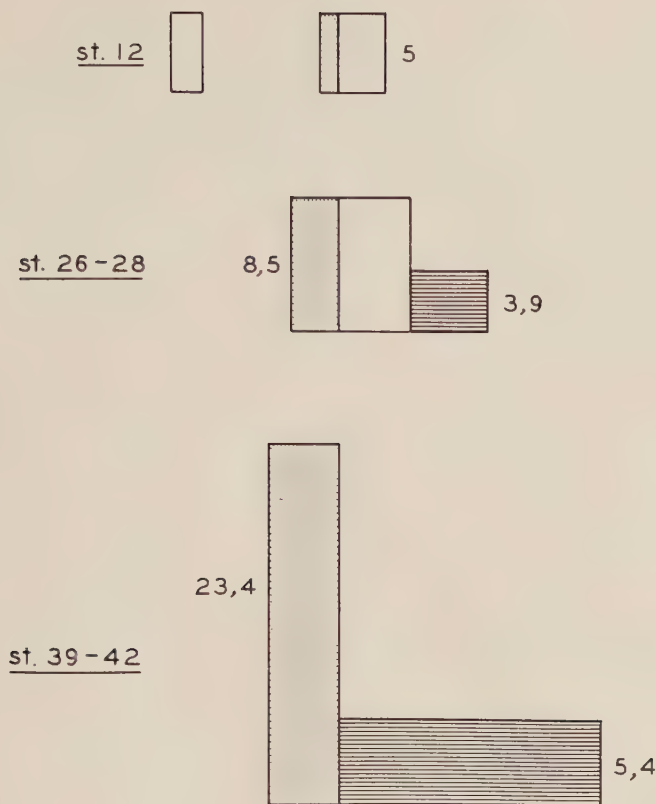


FIGURE 61.

Diagramme montrant l'abondance relative du RNA complémentaire dans les embryons de différents stades. Schéma basé sur les résultats de la figure 60 et du tableau 13. Les *zones hachurées* correspondent au mRNA *stable*, c'est-à-dire au mRNA qui n'est pas marqué après 11 heures d'exposition au $C^{14}O_2$, mais est marqué au P^{32} quand ce dernier est présent depuis le début de l'ontogenèse. Les *zones pointillées* correspondent au mRNA qui se marque durant une impulsion de 11 heures au stade 42. Le mRNA transcrit sur les mêmes sites dans les embryons plus jeunes est indiqué de la même manière. Aux stades 12 et 26-28, le mRNA instable est représenté par la somme des zones pointillées et des zones blanches. La *longueur des blocs* est proportionnelle au pourcentage du DNA qui peut être saturé par le mRNA de chaque classe ; elle est donc une mesure du nombre de sites transcrits sous forme de mRNA. Le mRNA présent au stade gastrula mais absent aux stades ultérieurs est représenté par le bloc séparé visible au-dessus à gauche. La *hauteur des blocs* est donnée en unités arbitraires obtenues en divisant la quantité de mRNA (en μg) présente dans un embryon sous forme stable ou instable (tableau 13) par le pourcentage du DNA dont chaque classe de mRNA est complémentaire. Cette hauteur est donc une mesure du nombre moyen de copies en lequel chaque classe de mRNA est présente.

sites représentés sous la forme de mRNA aux différents stades est la seule qui s'accorde avec les données de la figure 59.

Sur le schéma de la figure 60, les sites génomiques complémentaires du RNA de gastrula sont divisés en 2 groupes. L'un correspond aux séquences nucléotidiques communes au mRNA de gastrula et au mRNA de stades ultérieurs. L'autre groupe de sites génomiques est transcrit au stade gastrula seulement. L'existence de gènes dont l'activité est limitée au stade gastrula est suggérée par deux observations indépendantes.

a) Le RNA d'embryons avancés est moins compétitif vis-à-vis du RNA de gastrula que ce dernier ne l'est contre lui-même (fig. 54).

b) Le RNA de gastrula réduit de 50 % et de 30 % respectivement le niveau d'hybridation du RNA-C¹⁴ et du RNA-P³² de stade 28 (tableau 10). Un résultat analogue est fourni par l'expérience de saturation en 2 étapes résumée dans le tableau 11, A. Si tous les sites génomiques transcrits dans la gastrula (2,4 % du DNA) étaient aussi transcrits au stade bourgeon caudal, l'inhibition produite par le RNA de gastrula devrait être beaucoup plus forte (80 % et 50 % respectivement).

L'existence de gènes à activité transitoire n'a pas été confirmée par une expérience de saturation en 2 étapes (tableau 12), dont les résultats sont ambigus. La difficulté de mettre en évidence dans la gastrula des gènes à fonctionnement transitoire résulte sans doute du faible pourcentage du DNA dont l'activité est limitée aux stades initiaux du développement, comparé au pourcentage du DNA exprimé dans les embryons avancés (fig. 60). L'existence de mRNA spécifique pour les stades gastrula et neurula n'est donc pas prouvée.

La figure 61 combine les données de la figure 60 avec celles du tableau 13. Le RNA-P³² est censé représenter toute la population de mRNA présente dans l'embryon, aussi bien en quantité absolue qu'en variété de séquences nucléotidiques. La quantité absolue de mRNA et le nombre de séquences nucléotidiques représentés sous forme stable ont été obtenus en soustrayant la quantité (en μg) et le nombre de séquences nucléotidiques qui peuvent être marquées au C¹⁴ de celles qui sont marquées au P³².

4.3 LA PRODUCTION DE RNA MESSAGER AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

Comme l'ont déjà montré BROWN et LITTNA (1964 a), les embryons de xénope synthétisent très peu de mRNA durant la

période du clivage (fig. 58). La même observation a été faite pendant le développement de l'oursin, où la synthèse de mRNA est aussi de très faible importance durant la segmentation (NEMER, 1963 ; WILT, 1964 ; COMB, KATZ, BRANDA et PINZINO, 1965). Aussi bien chez les Amphibiens que chez les Echinodermes, la petite quantité de messenger présente durant les phases initiales du développement pourrait avoir été synthétisée durant l'oogenèse et mise en réserve sous une forme stable. Cette interprétation cadre bien avec les observations décrites précédemment concernant l'action de l'actinomycine sur les œufs de pleurodèle en segmentation (BRACHET et DENIS, 1963 et fig. 9). L'actinomycine commence à inhiber le développement embryonnaire et en particulier la synthèse protéique au début de la gastrulation. Or il se produit au même moment une très forte augmentation de la synthèse de mRNA (fig. 58). Il est logique de mettre en rapport ces deux observations et de conclure que le contrôle des noyaux sur le développement embryonnaire s'établit en fin de segmentation par une synthèse accélérée de RNA messenger.

Les résultats rassemblés en un diagramme sur la figure 61 montrent que 3 types principaux de gènes sont actifs au cours du développement embryonnaire.

1) *Il y a d'abord des gènes qui sont actifs dans les jeunes embryons (gastrula et neurula) et dont les produits disparaissent aux stades ultérieurs.* Comme il a été dit précédemment, l'existence de tels gènes à activité transitoire n'a pas pu être prouvée de façon définitive. Le RNA messenger spécifique pour les stades gastrula et neurula, s'il existe, pourrait être impliqué dans le contrôle des interactions cellulaires compliquées qui se produisent durant cette période du développement.

2) *Certains sites génomiques sont actifs à tous les stades postérieurs à la segmentation et probablement aussi chez l'adulte.* Le mRNA transcrit sur ces sites se renouvelle rapidement. Il est présent en beaucoup plus de copies chez l'embryon avancé que chez le jeune embryon. Ceci résulte probablement du fait que les embryons en voie de développement sont formés d'un nombre croissant de cellules [40.000 chez la gastrula et 600.000 chez le têtard de stade 42 (DAWID, 1965)]. Dans les quelques types cellulaires adultes examinés jusqu'à présent, on a chaque fois décelé une classe de mRNA à renouvellement rapide (HOYER et al., 1963 ; GIRARD, LATHAM, PENMAN et DARNELL, 1965 ; HENSHAW, REVEL et HIATT, 1965). Celui-ci coexiste, dans les tissus différenciés, avec du mRNA stable.

3) *Après le stade neurula, certains gènes entrent en activité pendant un certain temps, puis cessent de fonctionner. Les produits de ces gènes restent toutefois présents dans les embryons plus avancés sous une forme stabilisée*, mais apparemment en un nombre réduit de copies (fig. 61). Au cours du développement embryonnaire, l'apparition de mRNA stable est simultanée par rapport au processus de différenciation. La présence de molécules stables de mRNA a été observée dans plusieurs types de cellules différenciées : érythrocytes, (MARKS, BURKA et SCHLESSINGER, 1962 ; WILT, 1965), cellules hépatiques (REVEL et HIATT, 1964 ; HENSHAW et al., 1965), cellules thyroïdiennes (SEED et GOLDBERG, 1963). Dans les embryons en croissance, du mRNA stable apparaît dès avant le stade bourgeon caudal et s'accumule lentement dans la suite de l'ontogenèse. A la fin du développement, la quantité d'information transcrite sous la forme de mRNA stable est beaucoup plus grande que la quantité d'information envoyée continuellement par le DNA. Comme le têtard différencié est formé d'un très grand nombre d'espèces cellulaires, il n'est pas possible de préciser si les deux types de mRNA (stable et instable) sont présents dans les mêmes cellules ou dans des cellules différentes.

4.4 RÔLE POSSIBLE DU RNA MESSENGER STABLE ET INSTABLE.

Concernant le rôle respectif du messenger stable et instable présent dans les cellules différenciées, on en est réduit à des conjectures. Une interprétation tentante, mais purement hypothétique, serait d'attribuer à tout ou à une partie du mRNA instable quelque rôle régulateur dans le fonctionnement des gènes. Dans ce cas, le messenger instable pourrait ne pas être traduit sous la forme de protéine ; il ne quitterait jamais le noyau mais serait dégradé sur place. L'existence d'une fraction ribonucléique à métabolisme exclusivement nucléaire a été postulée à plusieurs reprises (HARRIS, 1963 ; HARRIS et LA COUR, 1963), sans être admise par la majorité des chercheurs. Quant au mRNA de forme stable, il pourrait être le produit de gènes de structure (cf. JACOB et MONOD, 1961) et servirait directement à la synthèse de protéine. C'est peut-être sa traduction continue en chaînes polypeptidiques qui protégerait cette classe de messenger contre une dégradation rapide. Ce qui est en tous cas établi, c'est que, dans les cellules différenciées, la synthèse protéique a lieu sans un recours continu à l'information contenue dans le DNA (PENMAN, SCHERRER, BECKER et DARNELL, 1963 ; REVEL et HIATT, 1964 ; WILT,

1965 ; BLOOM, GOLDBERG et GREEN, 1965). Cette indépendance vis-à-vis du génome s'établit progressivement durant l'ontogenèse.

5. CONCLUSION.

La libération de l'information génétique commence au moment où la différenciation débute. A mesure que celle-ci progresse, un pourcentage de plus en plus élevé du DNA est représenté dans l'embryon sous la forme de messenger. On peut estimer que 10 à 20 % du nombre total de gènes sont actifs à un moment ou l'autre du développement embryonnaire.

Le RNA messenger de la gastrula se renouvelle avec une demi-vie apparente de quelques heures. Entre la fin de la gastrulation et le stade bourgeon caudal, du messenger stable commence à apparaître. Il s'accumule dans la suite du développement, au point de former chez l'embryon différencié les trois quarts des séquences nucléotidiques représentées dans le RNA complémentaire. Le mRNA du têtard prêt à se nourrir se compose de deux familles de molécules : l'une est instable et transcrite en de nombreuses copies sur un petit nombre de sites génomiques ; l'autre est stable et a été synthétisée aux stades antérieurs sur des sites génomiques qui ont cessé de fonctionner.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'embryologie s'est donné pour tâche d'élucider la suite d'événements par lesquels une seule cellule — l'œuf fécondé — contenant un seul assortiment de chromosomes, se transforme en un organisme adulte formé de myriades de cellules agencées en de multiples organes. Ce que la cellule initiale reçoit comme information génétique consiste en une suite ordonnée de 4 nucléotides qui, étendue complètement, formerait une chaîne de plusieurs mètres de long (GALL et CALLAN, 1962). Il s'agit d'expliquer la manière dont cette information se traduit chez l'adulte en protéines spécifiques pour chaque tissu différencié. Il faut aussi expliquer comment cette information contrôle, jusqu'en ses moindres détails, le modelage de l'organisme adulte. Un tel problème est vaste et complexe et il n'est pas possible de l'aborder dans son ensemble à l'heure actuelle. On ne peut guère étudier aujourd'hui, avec quelque espoir d'en élucider le mécanisme, que la diversification initiale des cellules en foie, cœur, cerveau, etc. Le présent mémoire constitue une des premières tentatives dans ce sens. Il est apparu que, dès le début de leur diversification, les cellules recourent à l'information génétique contenue dans leur DNA. Cette constatation est appuyée par deux faits expérimentaux.

1. Dans les cellules traitées à l'actinomycine, la différenciation ne s'amorce pas. Or l'actinomycine a comme effet principal de se fixer sur le DNA et de rendre ce dernier inaccessible pour toute transcription sous forme de RNA messenger d'abord, sous forme de protéine ensuite.
2. Lorsque les cellules se différencient normalement, elles contiennent du RNA messenger complémentaire d'une région de plus en plus longue du DNA.

Ces observations montrent que la diversification des cellules est fondamentalement une affaire d'expression de l'information génétique.

Savoir que la différenciation cellulaire implique une libération de l'information contenue dans le DNA ne nous indique pas à quel

niveau cette libération est contrôlée. A cet égard, plusieurs mécanismes paraissent, *a priori*, possibles. On peut concevoir que, dans chaque cellule en voie de différenciation, se produit une libération complète de l'information génétique. Chaque type cellulaire contiendrait donc les messagers nécessaires pour l'élaboration de toutes les protéines de l'organisme adulte. La formation de protéines spécifiques pour les différents tissus résulterait d'une régulation au niveau ribosomique. Un tel mécanisme a été postulé récemment par KRUIH, DREYFUS et SHAPIRA (1964). Une autre manière d'expliquer la différenciation est d'admettre que la transcription de l'information génétique est contrôlée au niveau des gènes. Suivant ce modèle, les tissus en voie de formation ne contiendraient jamais aucune autre molécule de messenger que celles qui sont nécessaires pour la synthèse de leurs propres protéines.

Les expériences décrites dans la seconde partie du présent mémoire, en montrant que l'information génétique est libérée de façon progressive au cours du développement embryonnaire, excluent pratiquement le premier modèle énoncé ci-dessus. Toutefois, elles n'éliminent pas la possibilité qu'une régulation secondaire, semblable à celle qui a été observée durant l'infection virale (OHTAKA et SPIEGELMAN, 1963), intervienne à hauteur des ribosomes. La présence dans les cellules différenciées de quantités importantes de mRNA à vie prolongée est une forte présomption en faveur de l'existence d'une régulation au niveau ribosomique, seul mécanisme qui puisse contrôler la vitesse de traduction du messenger stable.

Pour mieux comprendre comment se produit la différenciation embryonnaire, il conviendra tout d'abord de rechercher au niveau du DNA le mécanisme qui déclenche l'activité des gènes au début de la gastrulation et la contrôle dans la suite du développement. L'identification de ce mécanisme et son élucidation posent de nombreux problèmes techniques aussi bien que théoriques. Dans les cellules différenciées, la plupart des gènes sont inactifs : 4 % au maximum de ceux-ci sont fonctionnels chez l'embryon différencié (fig. 61). La façon la plus simple d'expliquer cet état de choses est de supposer l'existence d'un système de répression inhibant l'activité de certains sites chromosomiques (ALLFREY, LITTAU et MIRSKY, 1963 ; BONNER et HUANG, 1963 ; BONNER, HUANG et GILDEN, 1963). Ce système doit être spécifique pour chaque tissu ; il doit être stable car il se transmet de cellule en cellule lors de la mitose, et réversible, car le noyau d'une cellule différenciée, introduit dans un œuf anucléé, peut

supporter le développement d'un embryon normal et donner naissance aux nombreux types cellulaires qui constituent l'organisme adulte (GURDON, 1962).

Si l'on postule une répression permanente du DNA, il faut admettre que ce dernier porte en lui-même une partie au moins de l'information nécessaire au contrôle de sa propre activité (BLOCH, 1962). Il est difficile d'imaginer, en effet, qu'une inactivation permanente du DNA puisse s'exercer par d'autres substances que des macromolécules : RNA ou protéines. Or la synthèse de ces dernières est contrôlée directement par le DNA. Mais un mécanisme de régulation absolue du DNA par lui-même, ne suffit pas pour expliquer la différenciation embryonnaire. Au cours de celle-ci, la destinée des cellules est déterminée par des interactions complexes, qui ne peuvent se produire qu'au niveau cytoplasmique. L'environnement dans lequel se trouve le DNA exerce donc certainement une influence sur son activité. Ceci nous amène à envisager, au cours du développement embryonnaire, un jeu d'interactions entre le DNA et le reste de la cellule, aboutissant à une répression du génome spécifique pour chaque tissu. Malheureusement, la nature de l'influence que pourrait exercer le cytoplasme sur le DNA est totalement inconnue ; elle est, au surplus, difficile à soumettre à une analyse expérimentale.

Parmi les modèles possibles d'interaction nucléo-cytoplasmique, celui qu'ont proposé JACOB et MONOD (1961) pour les Bactéries paraît des plus intéressants. Toutefois, un système soumettant l'activité des gènes à l'action de substances de faible poids moléculaire ne semble pas intervenir de façon générale chez les organismes supérieurs. Un tel système paraît réservé aux cellules plongées tout entières dans un milieu extérieur sujet à de brusques variations, ce qui réclame une adaptation immédiate de la part de l'organisme. C'est ainsi que, malgré de nombreux efforts, il n'a pas été possible de mettre en évidence un seul cas d'induction enzymatique dans les cellules embryonnaires. Ceci n'exclut cependant pas qu'un rôle puisse être joué au cours des processus de différenciation par des gènes régulateurs, dont l'activité serait contrôlée par un mécanisme autre que celui qui intervient chez les Bactéries. La présence dans les cellules en croissance d'une fraction de messenger à renouvellement rapide est un indice favorable à l'existence de tels gènes. Ainsi, la régulation du génome peut s'exercer à la fois par une répression permanente, et en quelque sorte passive, de certains sites chromosomiques et par l'intervention active de gènes régulateurs. Dans quelle mesure ces derniers pourraient

contribuer à l'établissement et au maintien d'une répression permanente du DNA est une question non encore résolue.

La conversion en protéines des séquences nucléotidiques contenues dans le DNA nous apparaît donc comme un phénomène complexe, soumis, semble-t-il, à plusieurs contrôles successifs. Un premier contrôle est certainement exercé au niveau du DNA lui-même, soit par un, soit par plusieurs mécanismes indépendants ou synchronisés. Un second contrôle intervient probablement lors de la traduction du messenger en protéines. C'est sans doute le jeu de ces divers systèmes de régulation qui permet à l'information uniformément inscrite dans le génome de se traduire en l'infinie variété de formes et de fonctions que prennent les cellules différenciées des organismes supérieurs.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur BRACHET (Université de Bruxelles) et Monsieur le Docteur EBERT (Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, Baltimore, U. S. A.) pour l'hospitalité que j'ai reçue dans leur laboratoire et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à mon travail. Je remercie aussi les Docteurs BROWN, DAWID, BOLTON, MAC CARTHY et BRITTEN pour les conseils qu'ils m'ont donnés lors de la conception et de l'interprétation des expériences.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide financière de l'OTAN (NATO fellowship), de la Carnegie Institution of Washington (Carnegie fellowship) et du Fonds National de la Recherche Scientifique (mandat de chargé de recherches).

BIBLIOGRAPHIE

- ACS, G., REICH, E. et VALANJU, S. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 68-79.
- ALLFREY, V. G., LITTAU, V. C. et MIRSKY, A. E. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 414-421.
- ARONSON, A. I. (1965), *J. molec. Biol.*, **11**, 576-588.
- ATTARDI, G., HUANG, P. C. et KABAT, S. (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**, 185-192.
- BAUTZ, E. K. F. et HALL, B. D. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 401-408.
- BERNS, K. I. et THOMAS, C. A. (1965), *J. molec. Biol.*, **11**, 476-490.
- BIELIAVSKY, N. et TENCER (1960), *Exp. Cell. Res.*, **21**, 279-285.
- BLOCH, D. P. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 324-326.
- BLOOM, S., GOLDBERG, B. et GREEN, H. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **19**, 317-321.
- BOLTON, E. T. et MAC CARTHY, B. J. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1390-1397.
- BONNER, J. et HUANG, R. C. (1963), *J. molec. Biol.*, **6**, 169-174.
- BONNER, J., HUANG, R. C. et GILDEN, R. V. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**, 893-900.
- BRACHET, J. (1942 a), *Arch. Biol.*, **53**, 207-257.
- BRACHET, J. (1942 b), *Acta Biol. Belg.*, **2**, 16-19.
- BRACHET, J. (1943), *Bull. Acad. Roy. Sci. Belg.*, **29**, 707-718.
- BRACHET, J. (1953), *Quat. J. Microsc. Sci.*, **94**, 1-10.
- BRACHET, J. (1962), *J. cell. comp. Physiol.*, **60**, Suppl. 1, 1-18.
- BRACHET, J. et DENIS, H. (1963), *Nature*, **198**, 205-206.
- BROWN, D. D. et CASTON, J. D. (1962), *Developm. Biol.*, **5**, 412-434.
- BROWN, D. D. et GURDON, J. B. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 139-146.
- BROWN, D. D. et LITTNA, E. (1964 a), *J. molec. Biol.*, **8**, 669-687.
- BROWN, D. D. et LITTNA, E. (1964 b), *J. molec. Biol.*, **8**, 688-695.
- BROWN, D. D. et LITTNA, E. (1966), *J. molec. Biol.*, à paraître.
- CASPERSSON, T., (1941), *Naturwiss.*, **29**, 33-43.
- CAVALIERI, L. F. et NEMCHIN, R. G. (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 641-652.
- COMB, D. G., KATZ, S., BRANDA, R. et PINZINO, C. J. (1965), *J. molec. Biol.*, **14**, 195-213.
- CRICK, F. H. C. (1963), *Prog. Nucl. Acid. Res.*, **1**, 163-217.
- DAVIDSON, E. H., ALLFREY, V. G. et MIRSKY, A. E. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 53-60.
- DAVIDSON, E. H., ALLFREY, V. G. et MIRSKY, A. E. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **52**, 501-508.

- DAWID, I. B. (1965), *J. molec. Biol.*, **12**, 581-599.
- DENIS, H. (1957), *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **87**, 501-536.
- DENIS, H. (1961), *J. Embryol. exp. Morph.*, **9**, 422-445.
- DINGMAN, G. W. et SPORN, M. B. (1965), *Science*, **149**, 1251-1254.
- FELLIG, J. et WILEY, C. E. (1959), *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 313-316.
- FICQ, A. (1961), *Inst. Interuniv. Sci. Nucl.*, Monographie 9.
- FRANKLIN, R. M. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 555-565.
- GALL, J. G. et CALLAN, H. G. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 562-570.
- GALLIEN, L. et DUROCHER, R. M. (1957), *Bull. Biol. France et Belg.*, **91**, 97-114.
- GEORGIEV, G. P., SAMARINA, O. P., LERMAN, M. I., SMIRNOV, M. N. et SEVERTZOV, A. N. (1963), *Nature*, **200**, 1291-1294.
- GILLESPIE, D. et SPIEGELMAN, S. (1965), *J. molec. Biol.*, **12**, 829-842.
- GIRARD, M., LATHAM, H., PENMAN, S. et DARNELL, J. E. (1965), *J. molec. Biol.* **11**, 187-201.
- GOLDBERG, I. H. et RABINOWITZ, M. (1962), *Science*, **136**, 315-316.
- GOLDBERG, I. H., RABINOWITZ, M. et REICH, E. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 2094-2101.
- GOLDSTEIN, M. N., SLOTNICK, I. J. et JOURNEY, L. J. (1960), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **89**, 474-483.
- GOMATOS, P. J., KRUG, R. M. et TAMM, I. (1964), *J. molec. Biol.*, **9**, 193-207.
- GOODMAN, H. M. et RICH, A. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 2101-2109.
- GREEN, M. H. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **52**, 1388-1395.
- GROSS, P. R. et COUSINEAU, G. H. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 321-326.
- GROSS, P. R. et COUSINEAU, G. H. (1964), *J. Cell. Biol.*, **33**, 368-395.
- GROSS, P. R., MALKIN, L. I. et MOYER, W. A. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 407-414.
- GURDON, J. B. (1962), *J. Embryol. exp. Morph.*, **10**, 622-640.
- HALL, B. D., NYGAARD, A. P. et GREEN, M. H. (1964), *J. molec. Biol.*, **9**, 143-153.
- HALL, B. D. et SPIEGELMAN, S. (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47**, 137-146.
- HARBERS, E. et MUELLER, W. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7**, 107-110.
- HARBERS, E., MUELLER, W. et BACKMANN, R. (1963), *Biochem. Z.*, **337**, 224-231.
- HARRIS, H. (1963), *Nature*, **198**, 184-185.
- HARRIS, H. et LA COUR, L. F. (1963), *Nature*, **200**, 217-227.
- HAYASHI, M., HAYASHI, M. N. et SPIEGELMAN, S. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 351-359.
- HENSHAW, E. C., REVEL, M. et HIATT, H. H. (1965), *J. molec. Biol.*, **14**, 241-256.
- HOAGLAND, M. L., STEPHENSON, M. L., SCOTT, J. F., HECHT, L. I. et ZAMECNIK, P. C. (1958), *J. biol. Chem.*, **231**, 241-257.
- HOLTFRETER, J. (1931), *Roux's Arch.*, **124**, 405-466.
- HOLTFRETER, J. (1943), *J. exp. Zool.*, **93**, 251-323.
- HOYER, B. H., MAC CARTHY, B. J. et BOLTON, E. T. (1963), *Science*, **140**, 1408-1412.

- HOYER, B. H., MAC CARTHY, B. J. et BOLTON, E. T. (1964), *Science*, **144**, 959-967.
- HURLBERT, R. B., SCHMITZ, H., BRUMM, A. F. et POTTER, V. R. (1954), *J. biol. Chem.*, **209**, 23-39.
- HURWITZ, J. et AUGUST, J. T. (1963), *Prog. Nucl. Acid Res.*, **1**, 59-92.
- HURWITZ, J., FURTH, J. J., MALAMY, M. et ALEXANDER, M. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1222-1230.
- JACOB, F. et MONOD, J. (1961), *J. molec. Biol.*, **3**, 318-356.
- JOHNEN, A. G. (1956), *Koninkl. Ned. Akad. Wetensch. Proc. Ser., C*, **59**, 652-660.
- KAHAN, E., KAHAN, F. et HURWITZ, J. (1963), *J. biol. Chem.*, **238**, 2491-2497.
- KAWAMATA, J. et IMANISHI, M. (1960), *Nature*, **187**, 1112-1113.
- KERSTEN, W. et KERSTEN, H. (1962), *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **330**, 21-30.
- KERSTEN, W., KERSTEN, H. et RAUEN, H. M. (1960), *Nature*, **187**, 60-61.
- KIDSON, C. et KIRBY, K. S. (1964), *J. molec. Biol.*, **10**, 187-198.
- KIRK, J. M. (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 167-169.
- KLEIN, N. W. et PIERRO, L. J. (1963), **142**, 967-969.
- KRUH, J., DREYFUS, J. C. et SHAPIRA, G. (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **91**, 494-505.
- KUTSKY, P. B. (1950), *J. exp. Zool.*, **115**, 429-460.
- LANE, B. G. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 110-112.
- LEVINTHAL, C., KEYNAN, A. et HIGA, A. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1631-1638.
- LISON, L. (1953), *Histochimie et Cytochimie animales*. Paris : Gauthier-Villars.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. S. (1951), *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAC CARTHY, B. J. et BOLTON, E. T. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**, 156-164.
- MAC CARTHY, B. J. et BOLTON, E. T. (1964), *J. molec. Biol.*, **8**, 184-200.
- MAC CARTHY, B. J. et HOYER, B. H. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **52**, 915-922.
- MAC FARLANE, E. S. et FRASER, M. J. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **15**, 351-357.
- MANS, R. J. et NOVELLI, G. D. (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 48-53.
- MARKS, P. A., BURKA, E. R. et SCHLESSINGER, D. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 2163-2171.
- MARMUR, J. (1961), *J. molec. Biol.*, **3**, 208-218.
- MARMUR, J. et DOTY, P. (1961), *J. molec. Biol.*, **3**, 585-594.
- MERITS, I. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 254-259.
- MIDGLEY, J. E. M. et MAC CARTHY, B. J. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 696-717.
- NEMER, M. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**, 230-235.
- NIEUWKOOP, P. D. et FABER, J. (1956). *Normal Table of Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam : North-Holland Pub. Co.
- NIRENBERG, M., LEDER, P., BERNFIELD, M., BRIMACOMBE, R., TRUPIN, J., ROTTMAN, F. et O'NEAL, C. (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**, 1161-1168.

- NIU, M. C. et TWITTY, V. C. (1953), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 985-989.
- NYGAARD, A. P. et HALL, B. D. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **12**, 98-104.
- OHTAKA, Y. et SPIEGELMAN, S. (1963), *Science*, **142**, 493-497.
- OSTERTAG, W. et KERSTEN, W. (1965), *Exp. Cell. Res.*, **39**, 296-301.
- PENMAN, S., SCHERRER, K., BECKER, Y. et DARNELL, J. E. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 654-662.
- PERRY, R. P. (1963), *Exp. Cell. Res.*, **29**, 400-406.
- PERRY, R. P., SRINIVASAN, P. R. et KELLEY, D. E. (1964), *Science*, **145**, 504-507.
- REICH, E. (1964), *Science*, **143**, 684-689.
- REICH, E., FRANKLIN, R. M. et TATUM, E. L. (1962 a), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1238-1245.
- REICH, E., GOLDBERG, I. H. et RABINOWITZ, M. (1962 b), *Nature*, **196**, 743-748.
- REVEL, M. et HIATT, H. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 810-818.
- REVEL, M., HIATT, H. H. et REVEL, J. P. (1964), *Science*, **146**, 1311-1313.
- RITOSSA, F. M. et SPIEGELMAN, S. (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**, 737-745.
- SCHERRER, K., LATHAM, H. et DARNELL, J. E. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 240-248.
- SCHOLTISSEK, C. (1962), *Nature*, **194**, 353-355.
- SEED, R. W. et GOLDBERG, I. H. (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**, 275-282.
- SHATKIN, A. J. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 310-313.
- SHATKIN, A. J. (1963), *Nature*, **199**, 357-358.
- SHATKIN, A. J., SEBRING, E. D. et SALZMAN, A. P. (1965), *Science*, **148**, 87-90.
- SPECTOR, A. et KINOSHITA, J. H. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 561-568.
- TAMAOKI, T. et MUELLER, C. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9**, 451-454.
- TOWNES, P. L. (1953), *Exp. Cell. Res.*, **4**, 96-101.
- VAHS, W. (1962), *Roux's Arch.*, **153**, 504-550.
- WALKER, P. M. B. et MAC LAREN, A. (1965), *J. molec. Biol.*, **12**, 394-409.
- WALLACE, H. et ELSDALE, T. R. (1963), *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, **6**, 275-282.
- WATSON, J. D. et CRICK, F. H. C. (1953), *Nature*, **171**, 737-738.
- WILT, F. H. (1964), *Developm. Biol.*, **9**, 299-313.
- WILT, F. H. (1965), *J. molec. Biol.*, **12**, 331-341.
- YAFFE, D. et FELDMAN, M. (1964), *Developm. Biol.*, **9**, 347-366.
- YAMADA, T. (1961), *Adv. Morphogen.*, **1**, 1-53.
- YANKOFSKY, S. A. et SPIEGELMAN, S. (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1069-1078.

RÉSUMÉ

1. Le rôle joué dans le processus de différenciation par le système de traduction de l'information génétique a été examiné par deux méthodes expérimentales. L'une a consisté à empêcher la transcription du DNA sous la forme de RNA messenger et de voir si cette suspension a une influence quelconque sur la différenciation embryonnaire. L'autre a été d'étudier par la technique de l'hybridation entre le DNA et le RNA les types de messagers synthétisés par les embryons en voie de développement.
- 2a. La transcription de l'information génétique a été arrêtée au moyen de l'actinomycine, substance capable de se fixer sur le DNA et d'empêcher la copie de ce dernier sous forme de messenger d'abord, sous forme de protéine ensuite. On a vérifié en premier lieu si l'actinomycine produit bien sur les cellules embryonnaires les effets qu'on attend d'elle. L'influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques a été étudiée chez les embryons de *Pleurodeles waltlii* par la méthode autoradiographique. En 6 heures de traitement, l'actinomycine réduit de manière considérable l'incorporation de l'uridine tritiée dans les noyaux. L'inhibition a tendance à croître au cours du développement et elle est plus forte dans les tissus animaux et dorsaux que dans les tissus végétatifs et ventraux. Après 20 heures de traitement, le marquage nucléaire disparaît totalement dans le tissu nerveux et presque entièrement dans les autres tissus. La synthèse du RNA semble plus fortement affectée par l'antibiotique que celle du DNA.
- 2b. L'action de l'actinomycine sur la synthèse des protéines solubles a été examinée dans les tissus embryonnaires de la même espèce. L'actinomycine inhibe lentement (25-35 % en 24 heures) l'incorporation de la leucine tritiée dans les protéines de la blastula et de la jeune gastrula. L'inhibition est plus rapide ultérieurement : elle passe à 65 % en 24 heures au début de la neurulation et à plus de 75 % à la fin de la neurulation. Le contrôle des noyaux sur la synthèse des pro-

téines semble faible ou nul pendant la segmentation, mais s'exerce de manière de plus en plus étroite à partir du début de la gastrulation. L'actinomycine inhibe donc rapidement la synthèse du RNA dans les cellules embryonnaires. La synthèse de protéines est affectée avec un certain retard.

- 2c. L'action de l'actinomycine sur une des premières manifestations de la différenciation embryonnaire, à savoir la formation du système nerveux, a été étudiée chez le pleurodèle au moyen de fragments de tissus combinés en explantats. En quelques minutes de traitement, l'actinomycine abolit la compétence de l'ectoderme, c'est-à-dire sa faculté de réagir à l'influence inductrice du mésoderme. En 1 à 2 heures, l'actinomycine supprime le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale. L'antibiotique arrête également la neuralisation de l'ectoderme, alors que celle-ci est déjà engagée. L'actinomycine interfère donc avec les étapes initiales de la différenciation embryonnaire.
- 3a. La validité de la méthode d'hybridation, en tant que moyen de déterminer le degré d'homologie entre plusieurs séquences nucléotidiques, a été examinée. Pour cela, les propriétés des hybrides formés entre le DNA et le RNA marqué d'embryons de *Xenopus laevis* ont été étudiées, ainsi que certaines caractéristiques des hybrides DNA-DNA. Les hybrides DNA-DNA et DNA-RNA ne se forment qu'entre les acides nucléiques de la même espèce ou d'espèces très voisines ; ils n'apparaissent pas quand le DNA est rendu inaccessible par l'actinomycine. Les hybrides DNA-RNA obtenus à 50 °C et au-dessus sont résistants à la RNase. Le point de fusion des hybrides DNA-DNA et DNA-RNA formés à 60 °C est 15 °C plus bas que celui du DNA natif. On en conclut que des régions imparfaitement appariées sont incluses dans les hybrides formés à la température d'incubation normale (60 °C). Les régions mal adaptées sont apparemment de faible importance, suffisamment pour ne pas mettre en doute la validité de la méthode d'hybridation, en tant que moyen d'étudier l'activité des gènes au cours du développement embryonnaire.
- 3b. Une comparaison a été faite entre des préparations de DNA extraites d'embryons entiers et de divers tissus adultes. Toutes les préparations examinées contiennent apparemment les mêmes séquences nucléotidiques. Environ 70 % des séquences

de bases présentes dans le DNA adulte peuvent être hybridées avec le DNA embryonnaire. Il est donc justifié d'employer du DNA d'origine adulte pour hybrider le RNA embryonnaire.

- 3c. Chez les embryons de xénope exposés pendant 1 heure au $C^{14}O_2$, 12 à 14 % du RNA marqué s'hybride facilement avec le DNA. Aucune différence significative n'a été décelée dans la composition en bases et dans le profil de fusion du RNA hybridable provenant d'embryons de divers stades. Le RNA hybridable a une composition en bases analogue à celle du DNA. Le RNA messenger de la gastrula est instable et possède une demi-vie apparente de 2 heures. Chez les embryons différenciés, il existe plusieurs classes de messagers possédant des vitesses de dégradation différentes. Certaines molécules de messenger se renouvellent avec une demi-période d'environ 1 heure. Certaines autres ont une demi-vie d'au moins 20 heures.
- 3d. Le type de messenger synthétisé par les embryons de xénope en voie de développement a été étudié par des expériences de compétition entre les RNAs de différents stades. Le pourcentage du DNA transcrit sous la forme de messenger aux divers stades de développement a été déterminé par des expériences de saturation. Le messenger présent dans les œufs indivis ou en clivage n'a aucune séquence nucléotidique commune avec le messenger présent aux stades post-gastrula. Le messenger de gastrula est complémentaire de 2,4 % du DNA. Le RNA de stade bourgeon caudal et d'embryons différenciés sature respectivement 5 % et 7 à 9 % du DNA.
- 3e. Certains sites génomiques actifs au stade gastrula restent actifs dans la suite du développement, tandis que certains autres cessent de l'être. Une partie des messagers qui apparaissent après la neurulation se stabilisent et restent présents aux stades ultérieurs, bien que les sites génomiques sur lesquels ils ont été transcrits ne synthétisent plus de RNA. A mesure que les embryons se développent, leur messenger comporte une proportion croissante de molécules stables. Chez l'embryon différencié, la population du messenger se divise en 2 classes distinctes. La première classe se renouvelle rapidement ; elle est transcrite en de nombreuses copies sur un petit nombre de sites génomiques. L'autre classe est complémentaire d'une grande longueur du DNA (6 %) ; elle a été synthétisée aux stades antérieurs par des gènes qui ont cessé d'être actifs.

4. Le DNA joue un rôle directeur dans les phénomènes de différenciation. L'information génétique est libérée dans les cellules au moment où elles commencent à se diversifier. Cette libération est progressive et se poursuit pendant toute la durée de l'ontogenèse. La différenciation des cellules semble dirigée au niveau du DNA par un mécanisme d'activation et de répression des gènes qui reste à élucider.

